

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-508881

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月5日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/02	Z N A C	9262-4B	
C 12 N 1/19		8828-4B	
9/90		9152-4B	
15/09			
	9281-4B	C 12 N 15/00	A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 37 頁) 最終頁に統く
(31)出願番号	特願平6-501587	(71)出願人	マルク エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国、ニュージャージィ 07056, ローウエイ, イースト リンカーン アヴェニュー 128
(36) (22)出願日	平成5年(1993)6月2日	(71)出願人	ユニバーシティー・オブ・ケント・アット・カンタベリー イギリス国、ケント・シー・ティー・2・7・エヌ・ゼント、カンタベリー、ザ・レジストリー(番地なし)
(56)既存文献提出日	平成6年(1994)12月12日	(74)代理人	弁護士 川口 和雄 (外2名)
(36)国際出願番号	PCT/US93/05318		
(37)国際公開番号	WO93/25676		
(37)国際公開日	平成5年(1993)12月23日		
(31)優先権主張番号	9 0 1, 7 1 3		
(32)優先日	1992年6月12日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 サッカラロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

(57)【要約】

酵母によって産生されるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分秘型タンパク質の収率を増加させる方法を開示する。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒトPDI又は酵母PDIを過剰的に過剰発生する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の組換え株を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

第十一章

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方
法によって、
 - (a) 組換え宿主内で尾端のタンパク質ジスルフィドイン
シメラーゼを発現させるステップ、及び
 - (b) 所記組換え宿主内で、ジスルフィド結合をもつ一つ
以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を
発現させるステップ
を含むことを特徴とする前記方法。
2. ステップ (a) でタンパク質ジスルフィドインシメラ
ーゼが軽量を阻害する組換え遺伝子か、タンパク質ジスルフィ
ドインシメラーゼ遺伝子をコードする組換え遺伝子セッタのコ
ピーを一つ以上含む質変種とに記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドインシメラーゼをコードする
遺伝子セッタが宿主細胞ゲノムに組込まれる構成をときに記
載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドインシメラーゼをコードする
遺伝子セッタが宿主細胞の複数のプラスミド上に含まれている構
成をときに記載の方法。
- トでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタン
パク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミ
ド上に含まれている前記段落 1 に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼが、一
つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の複数カセッ
トでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタン
パク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込
まれる前記段落 1 に記載の方法。
7. ステップ (b) のジスルフィド結合をもつ一つ以上
のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノム
に組込まれる前記段落 1 に記載の方法。
8. ケンパク質ジスルフィドインシメラーゼをコードする
複数カセット五つ目組換え遺伝子が同一プラスミド上に合
まれている前記段落 1 に記載の方法。
9. ステップ (a) の組換え遺伝子が導入動物である組
換え 1 に記載の方法。
10. ステップ (a) の組換え宿主が群島である組
換え 1 に記載の方法。

1. 肝母が Saccharomyces cerevisiae 又は Cryptococcus laurentii の酵母の株である酵母選査 1 に記載の方法。

2. 肝母が Saccharomyces cerevisiae の酵母の株である酵母選査 1 に記載の方法。

3. 肝母が Saccharomyces cerevisiae 又は Cryptococcus laurentii である酵母選査 1 に記載の方法。

4. ステップ (b) の選抜え過伝子がアンチターンである酵母選査 1 に記載の方法。

5. ステップ (b) の選抜え過伝子がマダニ真菌類タンパク質である酵母選査 1 に記載の方法。

6. 選抜えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドインシメラーゼである酵母選査 1 に記載の方法。

7. 選抜えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドインシメラーゼである酵母選査 1 に記載の方法。

8. 選抜えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼがヒトタンパク質ジスカルディンシメラーゼである酵母選査 1 に記載の方法。

9. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、
(a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼを生成するスチャップ、及び
(b) 前記組換え酵母細胞で、分岐ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一組以上の組換え遺伝子を説明せしるスチャップを含むことを特徴とする新記号方法。

2.0. 組換えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドインシメラーゼである酵母選査 1 に記載の方法。

2.1. 組換えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドインシメラーゼである酵母選査 1 に記載の方法。

2.2. 選抜えタンパク質ジスルフィドインシメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドインシメラーゼである酵母選査 2 に記載の方法。

2.3. スチャップ (a) でタンパク質ジスルフィドインシメラーゼ酵素を生成する組換え酵母細胞が、タンパク質ジスルフィドインシメラーゼがコードするタンパク質の二つの

ビーを一つ以上台も排水渠上に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする遺傳子カセットが複数個並列組成ノリに組込まれる構造図 2 に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする遺傳子カセットが各種の模型プラスミド上に含まれておる構造図 2 に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれておる一つ以上の遺傳子セクターでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする遺傳子を一つ以上のプラスミド上に含まれておる構造図 1 に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする遺傳子カセット及び組換え遺傳子が同一プラスミド上に含まれておる構造図 1 に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え蛋白をきりて以下の段階で増殖する構造図 1 に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え蛋白を約 2.0% ～ 2.5% の濃度で

増殖する構造図 2 に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンチスタンシンである構造図 2 に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマダニ抗凝血タンパク質である構造図 2 に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを產生する微生物 *Saccharomyces cerevisiae* における株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである構造図 2 に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである構造図 2 に記載の酵母株。

明 沢 菩
サッカロシセセセリピアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の誕生を増殖させる方法

使用の旨意

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分岐タンパク質及び植物表面タンパク質におけるジスルフィド結合の活性に関わる酵素である。呼吸酵素 PDI の保存された形 (α₁β₁γ₁δ₁ε₁γ₂γ₃) 「チカラドキシン様」活性部位を露出するように設計されたオリゴアクリレオチド (WCGHCKE) (配列番号: 1) を用いて、本筋の名は下等真核生物 *Saccharomyces cerevisiae* 中の *PDI* から得たリードコードする構造子を構成した。クローニングした遺伝子のスクレオチド配列及び推定配列は、分子量 59,000 及び pI = 4.3 の S 30 アミノ酸からなるタンパク質を予測させるが、これらは呼吸酵素 PDI の构造的特徴である。また、アミノ酸配列は呼吸酵素及び鳥類の PDI 配列に対して 80% ～ 82% の同一性と 53% ～ 56% の相似性とを示し、主鎖の構造が極めて類似しており、特に、各々が反復性である二つの 100 個基セグメント

が存在する。呼吸酵素及び鳥類の PDI に対する最も大きな相異は、導入された「チカラドキシン様」活性部位を含む復核 (ム、ム') である。日本産酵母は呼吸可能な分岐シグナル配列の発現を有しており、C 末端の 4 個のアミノ酸 (-HDSL) (配列番号: 2) は、該タンパク質が *S. cerevisiae* と *S. pombe* 小孢子 (E, R, L) の成分であるということを示している。この遺伝子 (*PDI*) を導入する) の複数のコピーを有する形態頻度はやはり他の PDI 遺伝子レベルを有し、平均された分子量のタンパク質を導入実験する。*PDI* 遺伝子は酵母ゲノム内非反復性であり、既知遺伝子には重複せず、また転写障害もできない事の一例、S 30 蛋白質をコードする。*PDI* 上遺伝子の遺伝子はハプロ致死性 (haplo-lethality) であり、これ半数遺伝子の遺伝子が生存能力 (viable ability) にとどめて必須のものであることを意味する。

チオール：ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分岐酵素の E, R, 内腔 (リコロカ) の活性部位タンパク質成分である。酵解素の構造分析、細胞内の位置及び発現部位に関して立証された一連の事項は、酵解素が分岐タンパ

タ質の生成である糖の活性を示すことを示唆しており (Freedman, 1984, Trends Biochem. Sci., 9, pp. 438-441)。これはその場での (in situ) 遺伝的変異結合の研究によって裏付けられている (Rothberg & Pierce, 1987, Biochemistry, 26, pp. 4179-82)。PDIを欠失しているマクロソーム膜が同時に脱離 (co-translational) タンパク質のジスルフィド形成の初期の段階を示すという発見は (Soll et al. 及び Freedman, 1988, Nature, 335, pp. 549-51)、該酵素が分離及び純化後タンパク質の生成の間に実験的ジスルフィド結合形成の過程としで機能することを意味する。この発見は、該酵素のうねりマウリックの触媒部位について知られていない事実、即ち該酵素がチオール、ジスルフィド交換反応を触媒して正味のタンパク質ジスルフィドの形成、即ち又は其活性化を触媒させ、且つ多數にわたる逆元され易く折り畳みのないタンパク質基質においてタンパク質の折り畳み及び本会のジスルフィド結合形態を触媒することができるという事実と一緒にしている (Freedmanら, 1989, Biochem. Soc. Symp., 15, pp. 167-179)。該酵素のDNA及びcDNAは複数例は数つかの種について知られています (Scherens, B. G. 1991, Yeast, 5, pp. 185-308; Farquhar, R. L. 1991, Gene, 100, pp. 81-89)。補充酵素の発現から推測して均質にした該酵素の作用のメカニズムに関する情報を得ている (Crespi et al. 1980, J. Mol. Biol., 142, pp. 43-62; Freedmanら, 1988, Biochem. Soc. Symp., 16, pp. 9-16; Gilbert, 1989, Biochemistry, 28, pp. 7298-7305; Lundstrom 及び Holmgren, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9114-9120; Kawakatsu 及び Freedman, 1990, Biochem. J., 275, pp. 385-393)。粗面におけるタンパク質の折り畳み、アッサンブリー及びトランシルケーションの仲介物質として現在決定されている多くのタンパク質因子 (Rothberg, 1989, Cell, 52, 591-601) のうち、PDIは明確に規定された

性質活性を有するという点で特有である。

PDIは補充酵素の遺伝子から容易に単離され、均質酵素は物理的な活性度PDI(4, 0~4, 5)を有するホモダイマー (homodimer) (2×57kD) である (Hillegaars, 1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-292)。該酵素はコムギ及び藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* からも精製された (Kazanaga, 1990, Biochem. J., 268, pp. 63-68)。該酵素は広範囲の基質で抽出されており、予測活性では、PDI活性は主に *secretory* において抽出可能であると断言された (Willemsen, 1988, FEBS Lett., 212, pp. 133-135)。最近になって、クローンングしたeDNA人配列に及んで由来する多くのPDIの完全なアミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edmann, 1989, Nature, 335, pp. 267-270)、ラシ由来 (Yamamoto et al., 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Pribat jaantem, 1987, EM

BO, J., 五, pp. 643-8)、等由来 (Scherens, B. G. 前出引用文献) 及びヒヨコ由来 (Parakkal et al., 1988, Biochem., J., 254, pp. 1005-1012) のPDIがある。これらの有活性酵素種に由来するタンパク質は全體を通して高度の配列保守を示し、いずれも、原則にマウスPDIと精製された数つかの経験的特徴を示す (Edmann, 1988, 前出引用文献)。最も興味なものは、並にに偏して座屈であり且つチオレドキシン、即ち精神性Cys残基の部に形成される活性部位ジスルフィド/チオール部を含む手小さいレッドクタス活性タンパク質に由来に前述した配列を有する疾患基因の100の二つの領域がPDI配列中に存在することである。チオレドキシンでは活性部位配列がEGCGPK (配列番号: 3) であり、PDI中に二つ存在する対応する領域は既報のCCGCK (配列番号: 1) を有する (PDI配列中に同定された後の既往領域、セーフ及び宿主性について述べて既往する)。

PDIに反応するか又は直接に関連した酵素は、ジスルフィド結合の基質以外の機能を目的とする研究で開

特表平7-508881 (B)

された。例えば、PDI-I が、S. R. 内の新生 (newborn) すなわち合成 (synthesis-synthesized) プロラーガンボリペptides の生産調節導導能を検証する結果を表す。²⁸ 興味深いのは、PDI-I がアラニン残基を含むアラニンペプチドとして作用するという事実が立証されている (PDI-I はアラニンペプチド)。1987 年、S. B. O. T. C. Bremen, ²⁹ pp. 644-7-49。また、PDI-I が細胞膜のアーチゴニコル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (*Oncotica-Habib*, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)。最近では、興味ある事実が、トリグリセリドを新生分岐リボタンパク質に変換する酵素体に関与しているという説も出ている (W. H. Hartmann, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDI-I は分岐タンパク質の開口閉鎖及び翻訳後修飾的代謝の機能を果たし得る (Freeman, 1989, Cell, 57, pp. 1669-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大多数は、複数の分子内及び／又は分子間ヒドロフィル結合を有している。此回実験結果

度がある。透青は、元気テンパク質の生合成度及び実験可能な着赤度率はどちらも、分子内リソウキド酸の増加によって低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれそれを構成する他のジスルフィド結合を認識して形成しなければならない複数のジスルフィド結合をリソウキンテンパク質（例えば細胞膜チロシンキナーゼ活性化因子）ではより大きい。

日本・ヨーロッパのジルスフィド結合酵素プロセスは、酵
誕と同時に、又は遅れて本格的酵素後取扱として起きた。
現在動向を追跡するに、R. H. 内藤の興味深び新合成タンパ
ク質の研究では、天然クヌクルフィド結合が既に形成されて
いることが判明している。日本・ヨーロッパのプロセスは、
分離酵素室内に量的に存在するタンパク質であり小分子の内
部面 (*Luminal face*) に局在する酵素、タン
パク質クヌクルフィドイソメラーゼによって被活性化されると想
われる (*Eur. J. Biochem.*, R. H., [1986], *Euro
pean Biocatalysis Society*, 2, 436-443)。この酵素は日本・ヨーロッパで、
広範囲のタンパク質基質においてオール-テングタンパク質一
クヌクルフィド複合体を軽易に形成し、天然タンパク質ジルスフィ

表半表7-508831 (B)

体温としては、下垂体ホルモン、インスロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその結合物質、並びに他の血清タンパク質が挙げられる。この種のタンパク質は既往の遺伝子工学の主要技術の一つであるが、細胞及び細胞内でのこれらタンパク質の発現における技術的問題では、これらのタンパク質を効率的に活性化捕獲装置として導入上で多くの問題があることが指摘された。その結果、一般的には細胞活性者、特徴的にはタンパク質の転写量及びジヌクレオフィド結合形態をより深く解析する必要が認識されるようになった。

單一の折り込みドメインを有するジスルフィド結合をもつケンバンパク質は通常、蛋白質にジスルフィド結合した状態を天然な収率で形成するためには、完全に還元、変性し、次いで二硫化ケンをもつて再結合することが必要である。このプロセスでは、ゆっくり再結合して天然のジスルフィド結合を形成する多くの種類にジスルフィド結合した形態の出来高が迅速に形成される。該プロセスは、オールメノジスルフド酵酔還元収量度（例えば GSH および GS-SG）及びアルカリ性半胱基によって影響される。此後及び供給ジスルフィド剤を再導入する前に、タンパク質側鎖のジスルフィド結合を解消するには、タブリックアミドナトリウムをナトリウム

ド形成の組成物に必要とされる性質を有する「Free drama, R. B. G. 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, 939-942」。該論文の抜要を明らかにする別の事項としては、(1)該酵素の組成分布がジスルフィド結合をもつ分高タンパク質の合成をされると考えするという事実 [Brockway, B. E. G. 1980, Biochem. J., 191, 873-878] 及び(2)多くの系で、異なる酵素群の量が、ジスルフィド結合をもつ分高タンパク質の合成度の生理学的変化に平行して変化するという事実 [Brockway, B. E. G. 1980, Biochem. J., 191, 873-878; Freedman, R. B. G. 1983, "Functions of Glutathione in Biochemical, Physiological & Toxicological Aspects", A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren & B. Mannerheim, Raven Press, New York, 271-282; Paver, J. L. G. 1989, FEBS Letters, 242, pp. 857-

382) が挙げられる。

酵母の有黒は、多くの動物種 [ショウジョウバエ, H. 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, p. 225-234] 及びコロギ [de Alzereido, G. M. V. S., 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で研究されており、分子構造及び動力学的性質の検討が実施された [Freedman, R. B. S., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, p. 939-942; Rockway, B. B. 及び Freedman, R. B. S., 1984, Biochem. J., 219, 57-59]。しかしながら、酵母は、子孫真核生物又は細菌にないてはまだ十分に明確されていない。少なくとも一部の酵母細胞タンパク質（例えばキラーゼ）はジスルフィド結合を含んでいるため、酵母と高等真核生物との間の、分離に関するタキニズム及び分子構成の実験的研究は、状態未定酵母細胞が酵母内に存在することを強く示唆させる。

簡便的に検索可能な性別細胞タンパク質の見出しのための万能検索（versatilis search tool）としての酵母の遺

因は、酵母ゲノムの固定された能力、及び表現能力と高率真核生物のそれとを組合（換えはグリコンダ化における相違）によって、ある程度の基礎を強いる。

本報では、酵母タンパク質リスト（ドライソメラーゼを看板発現する酵母元育生細胞内にジスルフィド結合タンパク質を検出するための新規の方法と、タンパク質リスト（ドライソメラーゼを選別発現する酵母元育生細胞株とを供給する。本報では、ジスルフィド結合をもつ結換え活性タンパク質の分離を実験的に且つ子細胞に堆積させる酵母元育生細胞を供給する。

実験の概要

ヒト及び酵母タンパク質リスト（ドライソメラーゼ（PD1））をコードするDNAを用意し、プロモーターと終止シグナルをコードするDNAを含む表現カセット又はベクターにクローニングする。PD1をコードするDNAを含む表現カセット又はベクターを宿主細胞内にトランスポーすると、該細胞は PD1 タンパク質を過剰発現する。これらのPD1 細胞産生細胞を、ジスルフィド結合をセウタンパク質の検出のための結換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分離は、PD1 選別酵母細胞群では、

通常レベルの PD1 を産生する宿主細胞と比べて実験的効率を増加する。

図面の簡単な説明

第1図は、マルコビーリアスミド上に酵母 PD1 をコードする遺伝子を有する至、*α*-D-glucosidase 用酵母細胞の無脂溶媒平板の SDS-PAGE 分離を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOT PLOT」ソフトウェア（UWOCG）を用いた酵母 PD1 とラット PD1 との間のドットプロットアライメント（dot plot alignment）を示している。両乳動作 PD1 のメイン構造は同じ傾向で指記アライメントの下に示されている。

第3図は、酵母 PD1 と大鼠の酵母に供するストラテジー及び結果を示している。バカル（b）は、*β*-D-*GAL* 1-HIS3 融合を用いて異型酵母の HIS3-A523

24 番の四因子（1 mol/L 400）分析の結果を示す。

第4図はプラスミド pUKC103 の構造を示している。

第5図はプラスミド pUC-*y*SP-hPD1 の構造を示している。

第6図は、pUC38-GAL100p (S) ADH5 と

としても知られているプラスミド p401 の構造を示している。

第7図はプラスミド pUC18-GAL10p-yPD1-HAD1 と構造を示している。

第8図は、K991 としても知られているプラスミド pK422/AT5 の構造を示している。

第9図は YEp24-GAL10p-yPD1 の構造を示している。

第10図は YEp24-GAL10p-MFa-hPD1 の構造を示している。

第11図は pUC-GAL11/10-hPD1/AT5 の構造を示している。

第12図は pUC-GAL11/10-yPD1/AT5 の構造を示している。

実験の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の取り扱い及び分離のプロセスは既述で複数である。著者系研究に基づいて思えば、30 種以上の遺伝子座標が開発している（参考文献を参考し、A. G., 1981, Methods Enzymol. 109: 1-24; F., 1984, P.D., 662-674）。これらの実験とし

諸表平7-508881 (ア)

分子群／又はジカルフィド結合形成の活性に関連していると想われる変数である。

本発明は、タンパク質ジカルフィドインシメラーゼ (PD I) をコードするDNAを過剰発現することにより、既従来有効性による組成及タンパク質の活性を増加させる方法を提供する。本明細書中のPD Iとは、分子内及び分子間ジカルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPD I遺伝子のDNA配列は当業界で知られている。これらの種の多様性の具体例としては、ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び豚等が挙げられる。

[Mizunaga et al., 1990, J. Biochem., 118, 846-851; Scherzer, 1991, Yeast, 7, p. 153-193]。

PD IをコードするDNAの構造における既報特許は母本の種別の既報又は組成であってよく、非組合的生物例えば藻類では、藻類動物及び他の脊椎動物の細胞及び細胞、並びに高等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは水生植物、細菌及び高等植物細胞内で高発現される酵素及びトロボ PD Iを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

うに、本発明では別の遺伝子型、例えば非組合的具徴として哺乳動物細胞、魚類腎臓、頭頸のような脊椎動物の細胞、造血細胞、並びに酵母及び放線菌群のような下等真核生物の種類も使用し得る。また、これも當業者には明らかなるよう、静止及びヒト口腔粘膜の細胞に由来するPD IコーディングDNAsの使用も本実用の範囲内に包含される。PD IコーディングDNAの前の遺伝子の非組合的具徴としては、ヒト以外の骨髄細胞、例えばラット及びマウス、非脊椎動物、例えば昆蟲、及びに下等真核生物、例えば酵母等が挙げられる。

Röckel et al. 及び Meyer の方法 (1982, Cell, 31, 43, pp. 619-628) の方法で、E. coliから調製したミクロソーム膜フラクションに粗画素レベルのタンパク質ジカルフィドインシメラーゼ (PD I) 活性を有していたが、該レベルは畜産細胞によって8-20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPD I (Mizunaga, 1993, Biochem., 31, 218, pp. 245-251; Lamber et al., 1985, Biochem., 3, 228, pp. 835-843) 及びコムギ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPD I (Röckel et al., 1982, FEBS Lett., 132, pp. 121-124) と既報の酵素が、該酵素の小脳灰の内側に存在することを示すものであった。該酵素は酵母酵素に対して構造的、アミドをコードする遺伝子をクローニングした。高度の酵素を示す可能性が最も高い候補は、著者側のPD Iにおいて重複して存在されたり、特に二つの重複遺伝子 (beta 1 及び beta 2) の組合でチオレドキシンに対して持めて強い活性を示すと及び、ドメインであると想われる。若狭郡中央支那郵便番号はP-700-2700000 (記入番号: 4) である (Parikkonen et al., 1988, 同上引用文献)。非選択性30マークオリゴヌクレオチドを標準コードンバイアス (bias) に基づいて設計し (Shapiro, 1986, Nucleic Acids Res., 14, pp. 5125-5143)、これを反復複合して、マルチコピーY-E-PプラスミドpMAB3内で複製した後生ゲノムライブラーのスクリーニングに使用した (Cronquist et al., 1987, Mol. Gen. Genet., 210, pp. 581-593)。スクリーンから二つの中でも優れて活性のクローニング (CT及UIC10と名付ける) が固

報告され、予備解離部位を有病した結果、声入部サイトはそれを1.4倍及び1.9、8倍であり、二つの挿入部位が共通の側面部位をいくつか有することが判明した。クローンC7の挿入部を見に分離した。

クローンC7が確かにPD上をコードすることを確認するためには、酵母区、cerevisiae f. sl 修飾D40／4c [g trp1 pvr2 his3 leu2 trp1] から、1986、E. M. B. O. J., L. pp. 603-608) をクローン7及び酵母プラスミドpM436で形質転換した。SDS-PAGE分析の結果、C7を酵母細胞内では主に58 kDaボリペプチドを産生を示し、おそらくは約72 kDaの第二のボリペプチドも過剰発現することが判明した(第1図)。また、二つの種の酵母細胞解離法をPD上性についてアセニシしたところ、C7を質転換株は11倍他のPD上性レベル(3.8、6×10⁻¹¹ U/mgタンパク質)を示した。これら二つの事実は、底物部位配列WCGCPCK(座置番号: 8)を有するE. L. porcogene 8をオレオドキシンは分子量が約1.2 kDaであるため(Porcogene、1970, J. Biol. Chem., 245, pp. 2868-70)、C7クロ

ーンがPD上をコードし、オレオドキシンをコードしないという見方を裏付けるものであった。

遺伝子上のPD上コード部位の位置を決定する(1) C7クローン7を用いたために、C7クローンを酵母の制限酵素で消化し、消化断端をニトロセルロースにトランスファーし、断端の80マー「遺伝部位」オサブクレオサドでプローブした。この操作では、5'側のGATTCH₃-CTT [フラグメントと、それそれ5'及び4'、5'側の二つの明らかに隔離しているGATTC H₃-CTT フラグメントとが固定された。後者のパターンは、底物部位のコピーを二つ含むPD上について示唆されるであらうように、「遺伝部位」プローブの複数が二つ存在し説くことを示唆するものであった。二つのGATTC H₃-CTT 部位からの予想DNRA分析では、荷電部位PD1に対して深い相間を示す結果よりOZR2 の存在が明らかにされたが、これらは遺伝部位ではないため、他にもGATTC H₃-CTT 部位が存在するに違いないことを示明した。この操作は、詳細な酵母細胞の作成とDNA配列測定によって確認された。元の制限酵素とオリゴスクレオチドプライマーとを用いて、二つの構造はIndT1 部位を含む2.6 kbのGATTC

CTT-GATTC H₃-CTT フラグメントの配列決定を両方の曲を行った。

DNA配列は、予測された分子量58、682の、830アミノ酸をもつボリペプチドをコードすることができるLS936bpの第一抜取り株の酵母名子供させた(Fastquier et al., 1986, 前出引用文献、第2回会場)。該抜取り株には、適度に多いタンパク質をコードする酵母由来DNAに典型的なコドンバイアスを有していた(Benzen et al. 1982, J. Biol. Chem., 257, pp. 3029-3031)。コドンバイアス指標(Codon bias index)の計算値は0.60であった。

決定されたスクレオチド配列の分離は、多量の標準的酵母プロモーター及びターミネーターをチープを明らかにした(Fastquier et al., 1986, 前出引用文献、第2回会場)。これらのコードは、抜取り株に於いて1.06と-1.23との間に位置する(TA)₁₄配列の一部としてのTATAボックス接着部位と、底座-2'01と-2'23との間のビリジンに富んだ領域(3'アタクレオチドのうちの3')を含む。実験には、TATA

結合マークターに接して、主にcerevisiae 4a 内での複数部位及び/又はボリアデニル化のシグナルと認定される部位(Zarzuelo及びMironov, 1985, Cell, 42, pp. 569-73)、及び真核生物ボリアデニル化部位(Prokudina et al. 及びBroome 1986, Nature, 324, pp. 211-4)の両方に於する複数が存在する。

C7クローンの先端部位が既零されたかどうかを調べるために、既取り株に対しても内側の800bp HindIII-CTT フラグメントを用いて、二つの異なる検索法、グルコース及びアセテートで、異なる増殖サイクル段階まで増殖させた後、cerevisiae 4aの二つの異なる株(CMD40/4c及びKQ2a [c/a ade1/+ ade2/+his31/+; Gattiono, 1979, J. Biol. Chem., 254, pp. 8965-8969])から選出した全ヌクレオチドのノーザン blottingをプローブした。酵母培養細胞では、グルコース及びアセテート培養細胞で第一の1' 830 bp断片が検出されたが、非培養細胞では断片は殆ど検出できなかった。酵母界のサイズは、KQ2aの5' 及び1' 断片内の前駆配列の

約200スクレオチドを考慮に入れて、既取引件により予測された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって実験的に正のPDIであることを強く示唆した：

(1) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに典型的なpI(4.1)とを対応させていた；

(2) 族アミノ酸配列は、BESTFITソフトウェア(BWGCG, University of Wisconsin)によって決定されたように、既に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI配列に對して、3D～52%の全体的同一性と、5.8～56%の全塗の相似度を示した；

(3) 族アミノ酸配列中の残基58～65及び403～410に「ナオレドキシド」活性部位の二つのコピーを含んでいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の直鎖アミノ酸鎖に對して高度のアミノ酸同一性を示す約90アミノ酸より成る内部残基(Internal amino acid sequence)の一部分であった(第3図)。該活性部位及び残基PDI配列を並べると(アミノ酸番号)、58及び65：残基の外側に、大きな空間を示す側鎖が存在することも明らかになった(第3図)。

G. F.ら, 1981a, Nucleic Acids Res., 9, 1049-1068)を参考する。8kbのBamH IフラグメントがPDIIコーディング配列内の58とRV部位に挿入されている(第3図)。エル(elf)に対する遺伝子を削除した。58と65を残す多量のAS3324([Spd]ding, A., 1988, Ph. D. Thesis, University of Kent)を、PDII-HIS残基を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDII遺伝子の二つの活性部位のうちの一つを機能非活性对立遺伝子で置換した。三つのHIS5'AS3324形質転換体(1, 2及び3)を更に調べた。いずれの場合も、二条件の組合せは分子量当たり二つの活性部位を発現しただけであり(第3図)、これらは統計的ミオニアであった。この結果は、生死活性がPDII-HISと完全に関連していることを示すものである。正確な遺伝子置換がHIS5'形質転換体Y1及びY2において生じたことは、8000倍のHIS401-11-8(セイコ)フラグメントをプローブとして用いる。PDIIで処理したプロットされた特異ゲノムDNAへのサインハ

また、コードされたポリペプチドの別の二つの特徴は、これのがC. cerevisiae小胞体の成分であることを示唆している。族タンパク質は、性状上の分類シグナルの特徴を有する層と層水溶性のN-末端配列をコードし(Gierasch, 1989, Biogenesis 1989, 23, pp. 923-930)、四つのC末端アミノ酸は既存E1Pのそれと同じである(Normington et al., 1989, Cell, 57, p. 1228-232)。且C. cerevisiaeの小胞体特徴シグナルであると報告されている(Pohl et al., 1988, EMBO J., 7, p. 1757-182)。

本発明者は、クローン化C. cerevisiaeのPDII遺伝子をPDIIと名づけた。この是、C. cerevisiaePDII遺伝子はゲノム内のたゞ一つのコピーを有する。これは、前述のG. S. kb HindIII-SmaIフラグメントを複数のゲノム構造物に対するプローブとして用いる高架橋ハイブリダイゼーションにより確認された。

第一のPDII遺伝子が生き残りにとって必須であるかどうかを調べるために、HIS3遺伝子【Monto等】

ハイブリダイゼーションにより確認された。PDII遺伝子は内部PDII基盤を含まないが(第3図)、HIS3遺伝子はヨードキシド部位を含むため(第3図)、これまでHIS3対立遺伝子は常に用いられる筈である。手割されたように、非活性質転換体AS3324では第一のPDII-HIS3(フラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体ではなくとも及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると指摘される8kbとバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDII遺伝子がHIS3対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ recessiveであることを立証するものである。

既存PDIをコードするDNAを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち低量のものを使用し得る。これらの方法の非商業的販売元としては、過半数の実験ベクター系内でPDII含有のDNAライブリーアーの選択に次ぐ、PDII遺伝子の直接的濃縮技術が挙げられる。別の方では、バクテリオファージはプラスミドシャトルベクター内で複製したPDII含有DNAライブリーアーを、PDIIタンパク質のアミノ酸配列から設計した蛋白質をオリゴヌクレオ

セドブロープマスクリーニングすることからなる。検査し方法は、プラスミドシャトルベクター内で複製したセドブロープD1をゲノムDNAライブラリー、酵母染色体部位の複数のアミノ酸配列をコードする複数のcDNAプローブでスクリーニングすることからなる。

当業者には容易に理解されるように、別のタイプのライブラリー、及び別の転写又は複製ダイグから複製したライブラリーもPD1をコードするcDNAの単離に有用である。別のタイプのライブラリーの未記載の具体例としては、酵母核外の形質トロード、脊椎動物及び下等真核生物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライブラリーが挙げられる。

当業者には明らかのように、通常のライブラリーは、PD1「活性を有する微生物又は細胞株から複製し得る」。PD1 cDNAを単離するためのcDNAライブラリーの形成や使用するための細胞又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に複数のPD1候補を選定することにより実施し得る。

cDNAライブラリーの形成は当業者に良く知られている標準的方法で実現できる。良く知られているcDNAラ

イブクリー雑種方法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

PD1をコードするDNAを適当なゲノムDNAライブラリーから複製し得ることも当業者には明らかであろう。

ゲノムDNAライブラリーの構成は當業者に良く知られている標準的方法で実現できる。良く知られているゲノムDNAライブラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

複製の方法で特許クローニングPD1は、複数のPD1を産生するため、適当なプロモーターと別の複数の転写質

制御メントなどを含む表現ベクターへの分子クローニングにより結果的に複数の、既知生物又は未知生物遺伝子内にトランスポーター導入。この種の操作を行うための技術は、例出のManiatis et al. T., 等の文献に詳述されており、当業者には良く知られている。

本明細書では、発現ベクターは、複数のウツクローン化コピーの組合せ、または人の通常な細胞内での翻訳に必要なcDNA配列であると示唆される。この種のベクターは、細菌、真菌、植物細胞、酵母、昆虫細胞及び動物細胞のような種々の宿主内で異種生物遺伝子を発現させるために使用し得る。

特異的に設計したベクターは、若林闇、鈴井は複数一箇又は複数一箇若林闇のDNAのシャーリングを可能にする。複数に複製した発現ベクターは、若林闇内での酵素的複製のための複製起点と、複数可逆なマークーを、複数の有効な制御装置若林闇と、高コピーエヌヘテの重テンショナルと、複数プロモーターとを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ成長因子を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、nRNPが高頻度でインシエートされを

ようとするプロモーターである。発現ベクターの赤道面的具体例としては、クローニングベクター、複製されたクローニングベクター、特異的に設計されたグラミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で複数のPD1を発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。複数のPD1を複数に複製する細胞の哺乳動物発現ベクターの赤道面的具体例としては、pMC2neo (Sirtasagene)、pXT1 (Sirtasagene)、pSG5 (Sirtasagene)、EB0-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPy-1 (8-2) (ATCC 37110)、pBPy-MM1neo (842-12) (ATCC 87224)、pRSVneo (ATCC 37198)、pRSVneo (ATCC 37198)、pRSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCY2 (ATCC 37460) 及び pZD255 (ATCC 37756) が挙げられる。

PD1をコードするDNAsはまた、複数の経済大都市細胞内での複製のために発現ベクターにクローニングし得る。複数元発現細胞は既知生物、鈴井は非同定的具体例として

細菌、又は真核生物、例えば脊椎類の具体例としてヒト、マウス、アカハラ及びラット等が挙げられる。並びに鶏血細胞、又は赤血球等が挙げられる。又例えば非宿主細胞具体例として Urocoeca 由来細胞株、及び根株えバクテリオウイルス説明と共に使用する Saccharomyces cerevisiae を用いる。

(S79) 走査橢円である。適当なものとして使用し得る由来の確実性財産の複数個の添付箇所其の添付箇所では、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1651)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、ST3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C1271 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) 及び MRC-5 (ATCC CCL 171) が挙げられる。

酵母細胞プロモーターは酵母由来内の PDI 2 連鎖子の構造を開始させる。更って、当該者には酵母に変換されるよう、酵母の酵母細胞プロモーター配列、又は外用度の具体例として、GAL1、GAL10、GAL7、Pg

KI-ADH1、ADH2、PHOSERGAP491 (EPD 2) を利用し得る。また、組換え由来内の PD 1 の為替をアッセイするため、適切なアッセイシステム、例えばイムノプロモット又は ELISA もしくはエンザイムイムノアッセイ (ELISA) を使用し得ることも當該者には明らかであろう。

且つ Escherichia coli は、複数由来資源としてのガラクトースの使用に拘束している酵素をコードする遺伝子を五つ有している。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラクトースペルメターゼ、ホスケダルコムクレーザの正規アソシメイム、ロードガラクトース-1-オスマートウターゼルトランスフェラーゼ及びウリジンホスカグテクトース-4-エピメターゼをコードする。ガラクトースが存在しないと、これらの酵素の表現はほとんど検出されない。細胞をグルコースで培養し、次いでガラクトースを培養液に加えると、これら 5 種類の酵素は RNA 記録のレベルで、少なくとも 1,000 倍だけ (GAL10 は例外であって、検出時に遅延される) 指標的に増加される。GAL1、GAL2、GAL5、GAL7 及び GAL10 連鎖子を分子

的にクローニングし配列決定した。それぞれのコーディング領域の 5' 端の構造及びプロモーター配列は、GAL5 連鎖子のコーディング領域に隣接して記述した。これらの実験で、ガラクトースの培養に必要十分なプロモーター及び酵素配列が決定された。

且つ Escherichia coli はまだ、酵母が ADH1 のアイソダイムをコードする三つの連鎖子を有する。これらの酵素のうちの一つである ADH1 には、且つ Escherichia coli が酵母化培養時に対応するエタノールを検索酵素として利用する能力に拘束している。ADH1 [アイソダイムをコードする ADH1] 2 連鎖子の酵素はグルコースにより異化代謝酵素活性が抑制されるため、0.1% (w/v) のレベルのグルコースの存在下では典型的な増殖の ADH1 2 連鎖子の酵素は実質的に行われない。グルコースが欠失しており且つ供給酵液濃度が存在すると、ADH1 2 連鎖子の酵素は 1.0% ~ 1.00% 増強される。この連鎖子は分子的にクローニングして配列決定し、酵母の初期酵解 (ラクトoseless) には必要十分な酵母互いプロモーター配列を決定した。

アルファ連鎖子プロモーターは、表現型的に且つある細胞内でのみ活性を示す。且つ Escherichia coli には S-1R として知られている四つの連鎖子があり、これらは主及び生産能の通常タイミングの別のローバーの活性に必要なケンパク質を合成する。この酵母酵素を検出する測定方法 (13) が用い、これらの連鎖子のうち少なくとも一つの他の連鎖子連鎖内に存在する。この突然変異率で

10%) は、GAL7 の酵素と M6K の酵素との間の競争に必要とされる且つ Cerevisiae 由来モチドである。このトリデカペチドは、組換え由来体内に送られ、グリコシル化され、タンパク質結合的にプロセシングされ、粗抽出から分離される最終供給酵素となるブレゼフロキシソニンとして表現される。この活性化的過程は、外因性リバプチドの表現ストラクチャーとして利用されてきた。アルファ連鎖子連鎖子は分子的にクローニングされ、ブレゼフロキシソニン配列を有する連鎖子のプロモーターは種々のオリベチドの種類及び分量に利用されてきた。また、Pg 5 連鎖子プロモーターは低濃度ホスフェートによって活性化されることが判明した。これは、酵母内で細胞タンパク質の生産率的に制御された表現にとって有用である。

アルファ連鎖子プロモーターは、表現型的に且つある細胞内でのみ活性を示す。且つ Escherichia coli には S-1R として知られている四つの連鎖子があり、これらは主及び生産能の通常タイミングの別のローバーの活性に必要なケンパク質を合成する。この酵母酵素を検出する測定方法 (13) が用い、これらの連鎖子のうち少なくとも一つの他の連鎖子連鎖内に存在する。この突然変異率で

は、3点での着地が有利を構成し、その結果、アルファ飛行段子プロモーターが不活性である非選択的に生／死の翻訳が発生する。温度をささぐでシフトすると、翻訳は選択的に生／死に切り替わり、その結果プロモーターが活性になる。例 4 PDI 搭載を有する他の装置は、後つかの異常ボリペチド下の制御された発現について説明されてきた。

当開考には容易に理解されるように、PDIの発現のための適切な酵素群は応用範囲の最初の中から選択される。選択的な酵素群の非選択的具体例としては、プロテアーゼ消失及び活性化したグリコル化酵素といったような活性蛋白質及び変換的酵素を見るものが挙げられる。

Saccharomyces 属には種々な種類がある。S. cerevisiae は多くの異常ボリペチドの構成元素DNAlk仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、S. cerevisiae と異なる他の種の間の区別の差別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くはS. cerevisiae と交換することができ、S. pombe とのプロモーターと同様の又は同じプロモーターを有していると思われる。結って、酵素群には容易に理解されるように、PDI 搭載のための組合せ

の適切範囲は、S. cerevisiae と S. pombe の別の中、例えば非選択的酵素群としてCandida glabrata、Ustilago maydis、Aspergillus nidulans、Neurospora crassa、Penicillium 及びTrichoderma にまで広がる。

幾つかの酵素群、例えばCandida glabrata、Humicola niger 及びTrichoderma は、唯一の酵素内消旋酶としてのメタノールの利用について選択的代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関する酵素であるアルコールオキシゲナーゼ遺伝子はPdi またはPdiM と呼ばれており、アルコールオキシゲナーゼモーターは既知されて、発現のメカニズム詳細に較本であることが示された。このような酵素可能プロモーターは、酵素内でのボリペチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris 内での異種遺伝子の効率可能な発現用のプラットフォーム上で優秀であることが判明した。この結果は、別の酵素群が活性型のボリペチドの構成元素DNAlk仲介発現のための帝王として機能する可能性を強調するものである。

次に、当開考には容易に理解されるように、PDI 搭載のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces cerevisiae と S. pombe 及び Candida glabrata と他の酵素群の種の種の非選択的具体例としてCandida、Aspergillus nidulans、Kluyveromyces lactis、Pichia、Saccharomyces cerevisiae を選びうるに由て広がる。

発現ベクターは、多くの場合、既存の既定の具体的にして形態的、トランスクレッショング、プロトプラスト融合法及び電気穿孔法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクターは有能性はクローリー的に導入し、後に分離して、PDIタンパク質を発現するかどうかを調べる。PDI 搭載宿主細胞クローリーの同定は、幾つかの方法、例えば非選択的具体例として既PDI了活性に対する免疫学的反応性、及び宿主細胞株をPDI活性の存在によって変換し導く。

PDI-DNAの発現はまた、in vitro によって選出した酵素活性分子を用いて実施し得る。合成の既判定酵素の選択システム、例えば非選択的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び酵母細胞抽出物中で各半分に粗抽出できる

と共に、酵母ベースのシステム、例えば非選択的具体例としてセルロソラーゼ産業内へのマイクロインジェクションで始まりに説明でき奉る。

選択者には容易に理解されるように、PDIは、細胞当たり毎のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた結果え活性力セットに生ずる組換え活性度であつて得られる。また、これも選択者には用ひらかであらうが、PDIは、細胞当たり毎のコピー又は複数のコピーで自家的複製プラスミド上に存在する組換え活性力セットに含まれる組換え活性度で表現され得る。

組換えPDIを発現する組換え宿主細胞は、別の組換え遺伝子の表現のための帝王として使用し得る。本発明の新規の方法は、母株元PDIを発現する宿主細胞内で、クリルフィード結合をもつ組換えタンパク質セコードするDNAlkを剪断させることにより、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の収率を実質的に増加させる。選択者には容易に理解されれるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ複数のタンパク質が產生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非選択的具体例としては、分離されるとそれを組換え結合活性を保有するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ基質又はタンパク質の導用のための組換えDNA構成物は、PDTについて詳述した方針によつて形成し得る。當業者には明らかなるように、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、組換えDNA同一のコピー又は複数のコピーで、有毛細胞ゲノムに組込まれた組換大鼠遺伝子セッテから発現され得る。また、これらも當業者には明らかであろうが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、組換大鼠同一のコピー又は複数のコピーで、自原核複製プラスミド上に存在する組換大鼠組合セッテから発現され得る。是に、これらも當業者には官能に理解されることであるが、PDTをコードするDNA及びリソウスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、組換大鼠同一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組込まれたセッテもしくはプラスミド上のカセット、又はこれらの組合せから同時に発現され得ることも當業者には明らかであらう。

組換え蛋白質細胞でのPDTの実験法は、PDTタンパク質を固定して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

を検出することができる近色型の複製PDTを取扱し得る。PDT複製方法は無つか存在し、表面に施している。更に複製等に由来する蛋白の複製について解説したように、組換えPDTは細胞密閉液及び脂溶性、又はならぬ脂溶性増加から、塩酸、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排離クロマトグラフィー、ヒドロキシアルバタイト吸着クロマトグラフィー及び酵母的粗朢細胞クロマトグラフィーを併用し組合せ又は僅々に並用して精製し得る。

更に、組換えPDTは、PDTに既存的なモノクローナル又は多リクローナル抗体を用いて形成したモノアブイニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDTに対する第一特異性抗体は、PDTに対して既存性を示す抗体をもむれ細胞抗体液から複製するか、又はKohler及びMilstein、*Nature* 255巻：405～407 (1975) に記載の方法を用いで、PDTに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の第一特異性抗体は、PDTに対する均一結合性を有する第一の抗体又は複数の抗体群であると定義される。本明細書中の第一結合 (トロポロビタリ

on antibody binding) という用語は、抗体種が導電の挿入又はスピトープ、例えば削刃のようなPDTと結合する能力を有す。豚臍膜細胞の抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ワニ等の動物、胚まじめウサギ等、免疫アジュバントを用いて又は用いないで、基本的な構成のPDTで免疫感作することにより選択する。

最初の免疫感作の前に免疫前負担を経験する。豚臍膜細胞免疫アジュバントと組合せたPDTを約0.1ml～1.0ml/mgで各動物に皮下注入する。経験した後免疫アジュバントの非選定的抗体剤としては、フロインドの完全アジュバント、カロインドの不完全アジュバント、ミックサン抗体、*Corynebacterium parvum* 抗原及びRNAを含む豚臍膜エマルジョンが挙げられる。最初の免疫感作は、尋常しきはフロインドの完全アジュバント中の豚臍膜、皮下 (SC)、腹腔内 (IP) 又はその両方で豚臍膜の筋肉に接觸することとなる。各動物から一定の免疫回数、好ましくは一回隔週で皮下して、免疫力強を測定する。動物には、最初の免疫感作法は、ブースター感作をしててもしなくともよい。ブースター感作をした動物には、通常、同様のフロインド完全アジュバント中豚臍膜を開

一絆度で与える。ブースター感作は、最大力量が得られるまで約10連続の回数で行う。各ブースター感作から約7日後、又は第一回感作行の後で約1週間後に動物から絞殺し、血液を採取し、アリコートを約-20°Cで保存する。

透析系マウス、胚まじめはBiotin/BiotinをPDTで免疫感作して、PDTと反応するモノクローナル抗体 (A6b) を製造する。マウスは、前述のように、IP又はSC経路で、皮膚の糸状導管のアジュバントに導入した約1.5mlの豚臍膜又は豚臍膜エマルジョン、1ml～約1.0mlより、胚まじめは約1.0mlのPDTで免疫感作する。胚まじめはフロインドの完全アジュバントを接觸する。マウスは自己體に最初の免疫感作を行し、約3～約5日後にはわだてて休息させる。免疫感作したマウスには、豚臍膜免疫活性液灌流液のよう免疫活性液約0.1～約1.0mlのPDTの投与からなる一回以上のブースター免疫感作を行、豚臍膜感作 (IV) によって生ずる抗体濃度を測定する。免疫感作マウスは妊娠ラットを用いて得る。免疫マウスは妊娠ラットと適当な雌雄相手、胚まじめは免疫感作液と、適度なハイブリドーマを形成させる条件にて混合して、

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合細胞の非選定的具株因としては、マウス骨髓瘤のS/NS1/A₂4-1-MPC-D-1とS-1-94及びS-2/0が挙げられるが、最も新しいのはS-2/0である。株細胞細胞及び骨髄細胞を、約30%～約50%の濃度で、酢1000mol/Lのボリエチレンジリコール中で融合させる。医薬者には会社の方針で、ヒホネサンサン、ナシシン及びアミノグリシンを添加したグルバッコ改善イーグル培養(DMEM)での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を観察する。約14、18及び21日目に薄層薄板ウェルから上清液を回収し、PDIを試験として用いる四酸イムノアソビツセイ(SPIRA)のようないもんノアセイによってスクリーニングし、抗体の性質を調べる。mAbのアイソタイプを調べるために、培養液を用いてWestern blottingアッセイでも検査する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、MacPherson等の細胞免疫技術(Short Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse及びPaterson編, Academic Press, 1973)によりクローニング

する。

細胞免疫測定(pot assay)からの4日後、ブリックラン紙膜(Breibl/Wakao)に、マウス骨髄細胞約0.5mLで、約2×10⁴～約5×10⁴のハイブリドーマ細胞を蒼附することにより、モノクローナル抗体をトドケテ10日後で収集する。細胞のトランクスマーから約8～12日後に洗浄を廻し、当該者に企画の方法でモノクローナル抗体を調製する。

約2ヶ月のシラス免疫液を含むDMEM中でハイブリドーマを増殖させてIn vitroのmAb収集を行い、十分な量の供給的mAbを得る。放射能入りを由来者に公則の方法で調査する。

被検又はハイブリドーマ培養液の既往歴を、確々の血清学的又は免疫学的アッセイ、例えば非選定的具株因として、沈降法、免疫凝集、ELISA(Centrline-Linker Immunoassorbent antibody)及びラジオイムノアッセイ(RIA)で測定する。既往のアッセイを用いて、被検又は既往及び既往歴由来中のPDIの存在を検出する。

当該者には容疑に懸念されるよう、第一精興田研究所

製造するものの前述の方針は、PDIボリペチドフラグメント又は完全抗原のPDIボリペチドに特異的な抗体即正反応を用意し得る。

抗体がアガロースゲル比色支體との共有結合を形成するようN-ヒドロキシシクレインメチドニヌクルで予備活性化したゲル支體であるAffigel-10(Biorad)に抗PDIを加えて、PDIが抗アフニニティカラムを形成する。抗体は、スペーサーフィームとアミド結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化ムスチルキ1M エクソールアミンHCl (pH 8)でクエンチする。カチオンを水及び0.2M ダリシンHCl (pH 2.5)で順次洗浄して、赤絶縁活性又は外來タンパク質を除去する。次にカラムをリン酸緩衝液洗浄液 (pH 7.2) 中で平衡化し、ドロップを含む活性化支體上清又は細胞抽出物をはくとりカラムに通す。該カラムをリン酸緩衝液洗浄液まで充てん (Add) がバックグラウンドに低下するまで洗浄し、次いでタンパク質を、2.5M ナトリウムクレジンHCl (pH 2.5) で溶解する。次いで、粗製PDIタンパク質をリン酸緩衝液洗浄液に對して透析する。

以下の実施例は本発明を適用するためのものであって、その適応を過度するものではない。

実施例 1

性別: 男

Saccaromyces cerevisiae
MD40/4C (MATα, leu2-3-12, ura3-2, his3-1, leu2-3-11, -18, trp1) R64A58824 (MATα/MAT⁺ his3-1, leu2-2, ura3-3, ura3-8, leu2-1, leu2-3) G, YEPD (1%バクトペプトン、1%酵母抽出生物、2%グルコース) 又はカロビ、各種栄養少量 (0.67gアミノ酸混合有機窒素ベース、2%グルコース、1%コハク酸、0.6% NaOH、50μg/m1メソイノシトール) に必要な培養及びアミノ酸を加えたもので30℃で増殖させた。

S. cerevisiae GJRY188 (MATα, ura3-8, leu2-112, ade2-1, ura3-2, his3-4; Brake, A. J. S. 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81,

特表平7-508881 (16)

D.P. 4842-4846) 及び B.I. 1995 (MATE, luc 2, luc 1, lacZ-52, lacZ-1-122, lacZ-3, lacZ: Jones, E. W., 1991, Methods Enzymol., 194, D.P. 428-452) の PDE 選択基質の酵素に適用し、適合な実施例に記載のようく操作させた。

大腸菌 (*Escherichia coli*) の DHS-a (lacZ-E44ΔlacZ-U169 (φ_SO1lacZ-ZAM15) と pSDR17 (lacZ-lacZ 2, lacZ-lacZ-1, lacZ-A3) をプラスミドスクエアシグネットに接種した。

実験例 2

DNA 溶液

耐酸性ケラーゼを用いた DNA 選択を、酵母酵母細胞 (S. CULI, BRL) の培養液に従って実施した。是れが S. CULI 上部漏出液の標準的プロトコル (Cohen らら, 1972, P. N. A. S. U.S.A., 69, D.P. 2110-9) 及び S. cerevisiae 細胞液の標準的プロトコル (Beaggs, 1978, Nature, 275, D.P.

実験例 3

PDL1 連鎖子の当量

高コピー数 PDL1-2-d, 2ミクロンベースベクターの MASA (Crouzel 及び Ouisse, 1987, 国際農業文獻) の B₁ 位にターニングした S. cerevisiae 連鎖 SKR2-d [a₁ / a₂ d₁ / d₂ e₁ / e₂ f₁ / f₂ g₁ / g₂] ; Ouisse, 1987, P. N. A. S. U.S.A., 84, 1031] に由来する DNA の部分的に lacZ-52 フラグメントを含む酵母ゲノムライブリマーーを、PDL1 連鎖子についてのスクリーニングに適用した。5' マーカリゴンタケテ F (5'-CTTACACTTACACACATTGAGGCTTAAT-3') (配列番号: 5) を、既往に保存されている「オレンドキシン酵母」菌株 (PVA PWCGHCK) (配列番号: 4) に対して、既知酵母コドンバイアスを用いて (Sakai らら, 1988

6, 新出引用文献) を選択した。

酵母込みスクレオチドラバ酵素オリガスクレオチドを分離すべく D-R-52 ロマトグラフィーを使用して、酵母ライフラリーをスクリーニングするために、酵母オリガスクレオチド DNA を [³²P]-dATP [Amersham, 3000 Ci/mmol, 1] 及び T4 逆ホリダセオキナクサセドキナーゼで末端修飾した。次のようなコロニーハイブリダイゼーションにより、約 20, 000 D.H.s は端修飾コロニーをニトロセルロースフィルター上でスクリーニングした。各ニトロセルロースフィルターを、さら加熱アルカリ F, 6×SSC, 1% テンハート液中、25°C まで 1 時間で 18 時間にわたりハイブリダイズした。酵母オリガスクレオチド (比活性 4, 8 × 10⁷ d.p.m./μg) を D.D.C. で 3 分間加热し、次いで不溶ハイブリダイゼーション基質液中で 2 ニトロ F に溶解し、フィルターに加えた。37°C で更に 16 時間インキュベートした後、フィルターを洗浄し、4×SSC, 0, 1% SDS 中で 2 分間温浴した。該フィルターを一物オートラジオグラフィーにかけた。

39 個の潜在的候補コロニーが同定され、これらを前述

のスクリーニングに更に 2 回かけると、その簇で 10 個の陽性クローリー (標識付き C7 → C10) が得られた。これらのクローリーのうちの二つ (C7 及び C10) の制限地図を形成し、クローリー C7 を後続の研究のために選択した。

実験例 4

DNA 選択の結果

酵母液に適した大きさのフラグメントを固定するためには、クローン C7 を一度の制限酵素で消化し、1% アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真菌プロカッティング剤 (Hybaid, Ltd.) を用いて Genescan Plusスタンプ (Dupont) にトランスファーした。次いで、Maniatis らの方案 (1982, 新出引用文献) に実質的に従ってフィルターを子孫ハイブリダイズし、その後、前段のようには実験修飾液中で 30 マーカリゴンタケテ F ブロープを加えた。ハイブリダイゼーションを 6×SSC 中 43°C で 24 時間実施し、次いで 2 回の洗浄を 200 ml の 2×SSC 中で 5 分毎行い、更に 2 回の洗浄を 200 ml の 2×SSC, 0, 1% SDS 中で 5 分毎行い、最後に 50 ml 中の 0,

表表平7-508881 (16)

$\lambda \times S S C$ 中で透析して回収した。次いでフィルターを -70°C で45時間オートラジオグラフィーにかけた。
プロテオキシゲーター法 (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 8462-8471) を用いて、クローニング時に由来する 2, 4 kb の bioG1 - bioR1 フラグメントを完全に配列決定した。配列決定に適した初期フラグメントを、Holmes 及び Quigley の迅速な方法 (J. Biol. Anal. Biochem., pp. 193-7) を用いて配列決定前に複数したプラスミド DNA と pUC18 とにナブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本鎖ベクター mp12 又は mp18 にクローニングした (Messing, 1989, Method 6, 56-59, 1-103, pp. 20-78)。一度の配列決定プライマー (15~18 ピー) を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカーベクター、又は予め複数した内因性 CT-DNA 斑点にアーリングする。プライマーのアーリングに先立ち、プラスミド DNA を 0.2 M NaOH、2 mM EDTA 中で 37°C で 30 分間加熱し、0.1% の 3 M 酢酸ナトリウム

書類別 5

RNA の調査及び解析

純 M 40/40 の常温増殖組 (5 × 10⁴ ~ 1 × 10⁵ 細胞/ml) 又は常温消滅組 (5 × 10⁴ 細胞/ml) から完全 RNA を抽出した。30 分間の抽出後 (30°C ~ 42°C) にかけた M 40/40 の倍数増殖組からも RNA を抽出した。完全 RNA は、実験的に日本標準の方法 (1989, Nucleic Acids Res., 11, 2287-2292) によって抽出した。

ノーザンプロット解析を次のよう実施した: 30% の完全 RNA を 20% ヘキルムアルギビド、50% 酢イソ

書類別 6

g411-1: HIS3 对立遺伝子の構造

HIS3 対立遺伝子を有する 1, 8 kb の BamH フラグメントをプラスミド MAT009 から取出させ (Monteiro, 1984, 前述参照文献)、1% 蛋白胨アガロース (SEGA) 上で電気泳動し、Maniatis らの方法 (1989, 遺伝学用文献) で、dNTPs と DNA ポリメラーゼ I のケレノフフラグメントとを用いて合成した。次いで PstI 上遺伝子の 1, 2 kb の PstI - PstI フラグメントを、プラスミド pUC19 のポリリンカーベーの SmaI - BamH 領域にサブクローニングした。最後に、HIS3 遺伝子を含む充満した BamH フラグメントを、PstI コードイング領域内の單一の SacI RV 位に連結した (第 3 図)。添られた g411-1: HIS3 对立遺伝子を 3, 0 kb の SacI - PstI フラグメント上に連結させ、滅菌アガロース上で電気泳動し、1 kb の核酸リチウム形質転換プロトコル (1989, 前述参照文献) を用いて二倍体株 A33324 と HJ-1 プロトトロフィ

セルムアンド中で 5 分で 15 分間加熱することにより変性し、次いで 8% カルボキシルデヒドを含む 1% アガロースゲル中で分離した。東洋 RNN を真空ロッティングユニットロセルロースフィルター (S & S, BA85) にトランスファーレ。該フィルターを 1.0 mM Tris-HCl pH 7.5 中で 5 分間水洗した。ハイブリダイゼーションを、1.0% デンヘート糊成、2 × SSC、5.0 mM 枸橼酸アンモニウム HgS、4.0% 半セラムアミド、0.1% SDS、4.0% μ - 級熱処理 DNA 及び 1~5 kb's の 1% のプローブ由で 42°C で一夜実施した。フィルターを -70°C で 1~5 時間オートラジオグラフィーにかけた。波長 550 nm のプローブは、PDR-1 遺伝子に由来する 0.8 kb の HIS3 11-9.11 (アラゲメント (Parra et al., 1989, 加藤引用文献、第 2 回参照)、並びにひきだ S322 にクローニングした)、carboxylase の 1.65 及び 2.85 ソリゾーム RNA が海藻酸の一部を含むプラスミド ScpT (Dr. E. S. Cox, University of Oxford から入手) である。これらのプローブは、ランダムプライマー法 (BCI) で製造者の指示に従って標識した。

(リボヌクレアーゼ) に影響を及ぼすのに使用した。

実験例 7

ラミニラルリボヌクレアーゼ

ラミニラルリボヌクレアーゼのPD_I活性のアセイを、H₁とH₆の方法 (1984, Macromol. Polym. Symp. 1, 102, p. 281-292) で実施した。

装置の説明

スクランブルリボヌクレアーゼ (scrambled RNA ラミニラルリボヌクレアーゼ) は、ラジウムに被曝されたラミニラルリボヌクレアーゼを含む完全に脱化した混合物である。これは、市販の (S) ワンダードリボヌクレアーゼから下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、5.0 mMトリス-HCl 液温液、pH 8.6、8.9、9.9 液温、1.0 mMジオキソチオトリートール (過酸可溶ジスルフィド結合に対して約 1.5 倍セル溶解量のジオキソトリートール) 中 8.0 mg/ml (約 2.2 μM) で、液温で 1.5 時間～2.0 時間、又は 8.5 度で 2 時間イン

反応液を室温で 6 日に脱化し、その直後に、脱ガスしたり、1 M 酸性尿素を加えさせた後、G-25 フラムから漏過することにより、過酸可溶蛋白質分離する。2.8 g の漏過液を透析テクションをモニターし、タンパク質含有フラクションをブールシ、天然リボヌクレアーゼを標準として用いて、タンパク質濃度を分光光学生物的に又は化学的に測定する。

過酸可溶ヌクレアーゼの試料を、1 M 酸性尿素で折り、5 ml の PBS に希釈する。固形尿素を最終濃度 1.0 M まで加え、硫酸アルミニウムを 0.1 M まで加える (アルミニウムは過酸可溶液中に存在するシアホートイオンと反応させるために沸騰され、カルバミル化によってリボヌクレアーゼを不活性化し得る)。1.0 M トリス-HCl 中、5 分に調製し、堆積を 2~3 回洗い清めて下す。その後にタンパク質は大気中によってラマン光に不活性化される。このインキュベーションの後で、5.5'-(アツオビス(2-エトロ乙酸)ナトリウム) を用いて若鶴チャコール基を調べると、再活性化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分子量 40,000 道氏チャコール)。

水溶液で PBS に懸念化し、0.1 M 酸性尿素で 6 日

badex C-25 から漏過することにより、スクランブル蛋白質を回収する。タンパク質含有フラクションをブールシ、5 M トリスで PBS 中に調製し、4°C で貯蔵する。

この方法によるとスクランブルリボヌクレアーゼの活性は通常 9.0~10.0 未満である。粗抽出物は液温中 4 度でも 1 週間まで活性を保つのである。あるいは、5.0 mM NH₄ HCO₃ pH 7.5 中に透析し、次いで液温洗浄して、-20 度で無菌箱に封瓶し凍結する由も良好な保存法としてもよい。

アセイの手順

基質、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2% の実地リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解酵素では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレアーゼ中の分子構造及び分子内ジスルフィドの空隙の強度に対する PD_I の作用は、天然リボヌクレアーゼの場合と同様に活性を示す。RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を操作的に測定する (concentrator return)。このようにして、PD_I の活性を、過剰にアリコートが採取されるタイロコース (1.0 mM-GOD-TS) インキュベーションによってアセイし、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を測定する。

タンパク質ジスルフィド-イソメラーゼの試料を、5.0 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5、最終量が 9.0 ml になるまで加え、1.0 mM デオキストリートール (1.0 ml の上部ストック溶液) と同時に 3.0 ml で 2~8 分間透析インキュベートする。トリス-HCl 液温液も使用し得るが、その場合は活性が約 25% 低下する。次いでアセイを、スクランブルリボヌクレアーゼの 1.00 μl アリコート (1.0 mM 濃度中 0.5 mg/ml) と 1.00 μl ストック溶液、每回新しく調製の蒸留により開始し、インキュベーション混合物を 3.0 ml に稀釋する。より小さい量数で操作する場合は、前述の量を 1/10 に減少して、無効アセイ量を 1.00 μl とし得る。1.00 μl アリコートを、5 分の時点で採取し、その後 2~3 分間隔で 1.0 分まで放置して、スクランブルリボヌクレアーゼの再活性化についてアセイする。各アリコートは、3.0 ml で 6 分で脱化した若鶴チャコール内で、0.25 mM の高濃度に凍結した酵母 RNA (5.0 g) の 5 ml ジェルストック液を含む 3 ml の TCA 液温液 (5.0 mM トリス-HCl 液温液、pH 7.5、2.5 mM KCl、5 mM MgCl₂) のアセイ混合物に調査に加え、Pierce

ヨードモーラー 3.5% 分光光度計(バンド幅 2.5 nm)のデュアル吸光モードを用いてサギボクアーティゲンを 8 時間にモニターし、A₂₆₀ (ε A) に対する A₂₈₀ の変化を測定する。RNA 加水分解速度(λ A 分⁻¹)は 1.5 ~ 2 分にわたって一定である。この速度に沿ってインヒビーションからのアリコトドの採取時間はプロットしたグラフは、1.5 分まで直線である。荷物移動(ミセルロジカル)の基底強度の初期(λ A 分⁻¹ 分⁻¹)を三つ組みアッセイの最初回分析で計算し(相関係数は最高で 0.99 である)、ランバダクタスフィドハイドロゲル電気泳動の結果とす。

シオトシイトールのみによるスクランブルリボスクレアーゼの非選択性活性化の強度を測定するために、酵素試験液を省略して対照サンプルを調製する。これからの濃度は通常は過量。 2×10^{-4} ムモル・分⁻¹であり、酵素試験液のタングバクタリスルフィド-イソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

I型症のタンパク質ジスルフィド-イソメラーゼ活性は
リボヌクレアーゼ解吸／分の速度でステランブルリボヌ
クレアーゼの最初活性を検出す量であると定義される。

本章小结

機器 L Y S 2 又は U R A 3 底に P D [電極カセット] を組み
なされたのゲルターの種類

UVS2での組み込みのためのベクターを下記の手順で構成した。プラスミドpRC19を用いて細胞化後、脂溶性ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのプラスミド名をpRC19で細胞化し、得られた2.7kbのカセットを「Hinc2」でベクターフラグメントをゲル精製した。精製フラグメントを下記の在成オリジンレオチドと連結した。

5' - 5 ATTCGGGGGGCGGAGCTTGCGGGGCG-3' (配列番号：6)

3'-CCCCCGCGTCGAACGCCGCGTCGG-5' (配列番号: ?)

族オリジナルタレオナドは、左の奥に針着米ぬと、右の奥に
白糸と、左の奥に白糸と、右の奥に白糸と、左の奥に
白糸と、左の奥に白糸とをこの順序で含む。将られたブラン
ド P U C - N o t s は、両端で左の奥部に直通するラ
キンがされた場の左の奥に左の奥部を含む。

URA 3系に組みむべき施設カセットのターダッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母菌 RA 3遺伝子型は、URA 10に由来する 1. [kb] の

Indole フラグメントであった [Parent, S. A. et al., 1988, *Anal.*, 1, pp. 82-183]。ブタスミドは U-C-Na を Hydride で処理し、チオ基アルカリ水素チャージで脱リン酸化し、I, 1'カルボキシ基を Hydride で U-RAZ フラグメントと連鎖して、ブタスミドは U-C-Na-U-RAZ となる。

LYS 2胚への初発ガセットの処置をもデーターティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。即ち上
LYS 2遺伝子を有するプラスミド LYS 2 p600 [Barn
et al., D. A. 及び Theorver, J., 1986, M
ol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-28
38] を EcOR I及びHind IIIで消化し、LYS 2
遺伝子を有する4.5kbのEcoRI-Hind III
リクランメントを、Xba I及びHind III
で消化したPUC 19にクローニングした。次いでこのブ
チスミドを Pvu II及びBgl IIで消化し、LYS 2
遺伝子を有する3.7kbのPvu II-Bgl II
リクランメントをゼン別出し、平滑末端化した。プラスミド LYS 2 p600を Hind IIIで消化し、子ケンアルアル
キオヌクレオタード及びリサン酸化し、末端封鎖化し、S. 7

KbpのLAS2フタグメントと連結した。断片の質を有する導られたプラスミドをpUC-N_o1-LYS2（pN_o1をも含む）で消化し、LYS2タンパク質コーディング配列の大部を含む3.0kbのN_o1フラグメントをゲル精製し、平淮（Etiomation）液化した。プラスミドpUC13をHindIで消化し、平淮液化し、3.0kbのLYS2フタグメントと連結して、組込みベクターpUC13-LYS2を得た。

実験 9

酵母アルカロイド分子リガーゼに結合したりトドリを液化する酵母の構造

ヒトPDIコーディング配列は、Pihlajaaniemiら（1987、前出引用文献）によって記載されている複数部分のcDNAクローン、p210及びp1であつた。ヒトPDI-cDNAの5'末端を有するp210に由来する0.45kbのEcOR1-PstIフタグメントをpUC18にクローンングして、プラスミドpUK

C159を得た。次いで既プラスミドpUKC159をEcOR1及びAVMで液化した（AVMは底面ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する）。得られた3.1kbのベクター断片（base 3.1kb）フタグメントをゲル精製し、下記の構造のオリゴヌクレオチドアブリーパーと連続した：

5'-AATTCCTTGTCCGGG-3'（配列番号：8）

3'-GAACTCCGGGCGCT-5'（配列番号：9）

既アブリーパーは底面ヒトPDIコーディング配列の6末端を有する、底面の分子リガーゼ配列への底面ヒトPDI配列の正確な結合を可能にするような位置にHindIで切断を有す。

次いで、導られたプラスミドpUKC159をPstIで液化し、子セレクションアルカリニッケルアーメーテで液化し、ヒトPDIコーディング配列の構造を有するプラスミドp1（Pihlajaaniemiら、1987、前出参考文献）に由来する1.5kbのPstI-PstIフタグメントに連続して、プラスミドpUKC159を得た。このプラスミドpUKC160をHindI（酵母オリゴアブリーパー内で切断する）で液化し、次いでHindIで

液化した。その結果得られた、底面ヒトPDIコーディング配列を有する1.9kbのHindI-HindIフタグメントをゲル精製し、StI-I及びHindIで液化したプラスミドpG54にサブクローンングした（pG54はアルカロイド因子（M_F54）プレコモーターを有する；Shaw, K. J. ら、1988、DNA, 1, 17-126）。平淮液化したStI及びHindI液化の際に形成された結合部は、HindIプレコモーター配列とヒトPDI底面部分との間の正確なインフレーム結合を構成する（導られたプラスミドpUKC161と命名した（図4）。

LYS2組込みベクター-pNL（pUC-N_o1-LYS2）をStI及びHindIで液化し、T4-DNAポリメラーゼでの透壁によって平淮液化した。プラスミドpUKC161をEcOR1及びHindIで液化し、その結果得られた、GAC10プロモーター-アルカロイド因子プレコモーター-ヒトPDI底面カセットを有する2.8kbのEcOR1-HindIIIフタグメントをゲル精製し、T4-DNAポリメラーゼでの液化

によって平淮液化した。初期平淮液化を介しベクターフタグメントと底面カセットフタグメントとを互いに連結し、底面結合部位を用いて是、GAC10-HindIII-TCTC-S592を液化した。所期の構造を有するプラスミドを有するものについて配置板液体をスクリーニングし、得られたプラスミドpNL-M_F54-H_PD1を多量に製造した。pNL-M_F54-H_PD1をN_o1で液化すると、両端でLYS2-DNA配列にブランクングされたり、2.8kbの底面カセットが導かれる。液化したDNAを用いて、スフェロプラスト法で（Jalilanan A. ら、1978、Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 75, pp. 1929-1933）、是、GAC10-HindIII-1995及びTRY188を移管せられた。N_o1末端はターゲットティングバイスとして作用しながら底面カセットを底面LYS2座に向かわせ、底面で底面カセットが相同期換を介して液化された。配置板液体を、アルティアミノアブジン酸底面板を当面で導用するものについてスクリーニングした（Ghosh & Gao, B. B. ら、1978、Genetics, 93, pp. 51-58；Baranovskaia及びThornton, 1986、前出

参考文献)。このような増殖は、株が「ヨリ」であることを意味する。LYS2プローブを月刊で行ったクローン筛选体のサンプルプロット分析で、無菌シートがLYS2座に吸込まれたことが確認された。BL11で消化した染色体DNA凝胶電気泳動では、LYS2プローブとハイブリダイズするバンドについて、5、0から8、8kbへの渐進的サイズ変化を示した。その結果得られた、吸込み凝胶カラセトを含むBL11とBL11及びRLY1188を、それだけBL11とRLY1188のアルファートPDI(株#1072A)と命名した。

第10章

数値 P.D. 1 及びヒト P.D. 1 シグナル配列を用いるヒト P.D. 1 を過剰発生する能合性の検出

PDI cDNAクローニング (Pthiisianie
m16, 1987, 紙面原文版) を P_{E. coli} 上で発現し、
ヒトPDI cDNAの3'領域を有する。Ssp IとB
puI-Eco RIフラグメントをゲル精製した。次いで
各フラグメントを pUC115 (vector表現形の如き)
のEco RI位点に導入してプラスミドpUCX15をも作
成した。

た。該プラスミドは、完全な生長ヒト PDI cDNA を含んでいた。該 UUC151を Hinc II で消化し、過剰なオリゴリナラセチドアグリマー (λ -GCR) 調製剤を用いると推測して、PDI cDNA の 3' 端に位置する Hinc II 位と Bgl II 位に変換した。得られたプラスミド pUCK153は、2. 1 kbp の Bgl II フラグメント上の完全ヒトPDIコードинг配列を含んでいる。該プラスミド pUCK153を Bgl II 及び Pst I で消化した。その結果得られた、ヒト PDI 基因の 5' 部分及び 3' 部分をそれぞれ得る 0. 47 kbp の Bgl II - Pst I フラグメント及び 1. 7 kbp の Pst I - Bgl II フラグメントをゲル精製した。pUC19を Bgl II 及び Pst I で消化し、2. 7 kbp のベクターフラグメントをゲル精製し、次いで前述の 0. 47 kbp の Bgl II - Pst I フラグメントに接合した。既往培養細胞を用いて茎、 λ -GCR ATCC 35591を易感細胞とした。既往の標準を有するプラスミドを含む形質転換細胞からプラスミド DNA を精製した。既往 DNA を λ -GCR 及び Pst I で消化し、ヒト PDI 配列の 5' 部分を有する 0. 38 kbp フラグメントをゲル精

製した。

DUC19を ScORI及びBamH1で消化し、2.7 kbのペクターラゲメントをゲル精製した。下記中オリガミタリボンドを合成した。

ガリゴヌタクレオタ#15165-220及び15165-2-24をキーティー処理し、次いでそれぞれガリゴヌタクレオタ#15165-221及び15165-250をアニーリングした。ヒトPDIシゲラブルクド配列を有するヒトPDIをもろ煮るために、下記の過程を行った。
pUC19-2-Tkbp BamHI-PstI ラ
タグメント4, 7-kbp PstI-EcoRI 1
pDI' フラグメント、0.38-kbp PstI-A
X11-5' -トPDI' フラグメント、端部にアニーリング
したサンカ-15165-220及び15165-221
と混合した。

脚毎PDIシグナル配列を有するヒトPDIを所持する
ために、下記の過剰発現条件を形成した：pUC19-2.
7 kbp BamH I - EcoRI フラグメントを1.7
kbp Pst I - EcoRI ヒトPDI' フラグメン
ト、0.38 kbp Pst I - Avai I 5' - hPD
I フラグメント、及びヒアーリングしたリントカ-1 5' 1
5-249番アミノ酸151-250と連結した。(アエ
リーシングしリントカは BamH I 及び Avai I を用いて
を含み、削除されたシグナルペプチド配列が該部5' 領

特表平7-508881 (21)

細胞サイマー配列をコードする)。

雄性融合物を、c o l I ATCC 35691中に形質転換し、赤青色を有し、所用の酵素を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。オリゴヌクレオチドリシンカートラシングD N Aとそれを含む標的位にわたって延びるD N A配列を、ジオキシン配列法を用いて確認した。該D N Aシグナルペプチド又はヒトP D Iシグナルペプチドを有するヒトP D Iコードィング配列を、それぞれy S P -h P D I及びy S P -h P D Iと命名した。これらのカセットを含むこのようにして得た二つのプラスミド(それぞれy U C -y S P -h P D I(第5図)及びy U C -y S P -h P D I)をS m e I及びB a b Iで消化し、その結果得られた、h P D Iカセットを残す1.5 k b pフラグメントをゲル検出し、不純未除去した。

プラスミドy 401(赤青色を有し、所用によって分離されたG A L 1 10プロモーター及びA D H 1転写ターミネーターを含む; 第6図)をB a b Iで消化し、不純未除去し、前述のカセットと連結して、それぞれプラスミドy G A L -y S P -h P D I及びy G A L -y S P -h P D Iを得た。これら二つのプラスミドをS m e I、S p h

I及びXbaIで消化し、その結果得られた、G A L 1 10プロモーターとP D I及びG A L 1 10プロモーターとP D Iを有する複数カセットを得た。2 k b pのS m e I-S p hIフラグメントをゲル検出し、不純未除去し、次いでy U S 2端末配ベクター-pUC13-1 Y S 2のXbaI部位(不純未除去した)に挿入した。得られたプラスミドを、それぞれy P D I-S 2-h S P -h P D I及びy P D I-S 2-y S P -h P D Iと命名した。

組込み新規転換のためには、前記二つのプラスミドをXbaI及びXbaIで消化し、y U S 2アランキンシメチケを有する複数フラグメントを形成し、該複数フラグメントを用いて群集B I 1 9 9 5及びJ R Y 1 8 8を導入した。所用の複数カセットをy U S 2に組込んだ新規転換体を、B a b Iで消化したゲムD N Aのサザンプロットによって確認し、次いでy U S 2プローブとハイブリダイズした。得られた群体は、B I 1 9 9 5/h S P -h P D I、B J 1 9 8 5/y S P -h P D I、J R Y 1 8 8/h S P -h P D I(株#1148)及びJ R Y 1 8 8/y S P -h P D I(株#1157)であった。

ゲル精製した。次いで下記のオリゴヌクレオチドアダプターを合成した:

5'-GAGGACCTGGAGAACCTUSAGAAGGCGAGAACGCCAGACATGAGAA-
3'-CCTGTGGTGGCTCGTGAGTTCTTGTCTTCCTCGGTTTAACGCTTC-
5'-GAGGATACCGAAAATTGTTGAGCAAGGAGTGTAAAGGATCC-3'
(配列番号 : 1a)
5'-CTGGCTTGCTTCACAGCTGTCACITTAACATTCGCAAGGCTAA-3'
(配列番号 : 1b)

実験 四

ヒトP D I又は組み替P D Iシグナルペプチドを用いるヒトP D IのC末端H D E L突然変異体を過剰発現する酵母株の構成

小鼠体内に存在する酵母タンパク質は通常、小鼠体内での保護のためのシグナルであるC末端H D E Lをアミノ酸配列を含む(Petersonら, 1988, 同上引出文献)。これに対し、ヒトP D Iは、酵母内でのER膜折に属しては余り感動しないことが明らかにされた(Lowrie等, M. J., 1990, Cell, 61, pp. 1359-1363)C末端K D E L配列(P t h I-Iaalement, 1988)の酵母H D E Lを変化している状態ヒトP D Iを構成することが求められた。これは下記の方法で達成された。

二つのプラスミドy U C -y S P -h P D I及びy U C -h S P -h P D I(実験四)をB a b I及びXbaIで消化し、その結果得られた、ベクター配列とP D I配列のS'部分とを含む、0.5 k b pのS m e I-XbaI フラグメントと、h P D Iコードィング配列の中間部分を含む0.5 k b pのXbaI-XbaI フラグメントと

二つのオリゴのアニーリングに次いで、該アダプターをXbaIで消化し(B a b I及びXbaI付着末端が削られる)、二つの酵母の次いで、それぞれ5'-y S P -h P D I又は5'-y S P -h P D I配列を含む、0.5 k b pのS m e I-XbaI ベクター-フラグメントと連結した。得られた二つのプラスミドをXbaIで消化し、h P D Iコードィング配列の中間部分を含む両端の0.5 k b pのXbaI-XbaI フラグメントと連結し、ヒトP D Iコードィング配列を再構成するためにXbaI フラグ

特表平7-508881 (22)

メントが正確な方向で挿入されたプラスミドpUC-Y-S-P-hPDI (HDEL) 及びpUC-18-S-P-hPDI (HDEL) を得た。これら二つのプラスミドを BamH Iで消化し、発現カセットを含む二つの異なるI, S, Kとp-BamHI Iフラグメントをゲル電気泳動、次いでpUC-18のBamHI部位に導入して、それぞれpUC-C-G△とL10P-YSP-pHDI (HDEL) 及びpUC-C-G△L10P-YSP-pHDI (HDEL) を得た。これら二つのプラスミドもSma I, Sph I及びPvu IIで消化した。得られた二つのI, S, Kとp-Sma I-Sph I Iフラグメントをゲル電気泳動、発現を確認し、次いで、そのM_rをL10Pで消化しておいたpUC18-LY82と連結し、平滑末端化した。得られた二つのプラスミドLY82-ySP-pHDI (HDEL) 及びLY82-bSP-hPDI (HDEL) をHpa II及びBpu I RVで消化によって末端化し、次いで別途のKm^rで布B3T3-19.5及びJRT-18A8の形質転換液に接種した。LY82形質転換体を、アルブミンアノニアジビン酸骨髄細胞培地上で選択した。LY82細胞は記述込んだ両薬の耐性カットを含む基質酵素、グロブリンDNAのサブサンプル分析によって

用だした。使られた鉄を、BJ1995/ySP-bPD
1 (はDBL)、BJ1995/hSP-hPD1 (HD
BL)、JRY188/ySP-bPD1 (HDSL)
(株#12687) 及UJRY188/hSP-hPD1
(HDSL) (株#1267) と名ました。

第3章

標準アルファ 因子分級リーダーを用いるはト P D I の C 指
標 H D E し天然乾燥性を適切に示す諸色の標準

プラスミドPUC-KC161（第4回）をBamHI及びClaIで消化し、アルファ因子プレプロゲーナ-延長ヒルトPDIの5'一セグメントとを有する0.7kbのBamHI-ClaIフラグメントをゲル精製した。プラスミドPUC-αSP1-HLPDI（KDBL）（実験例11に記載）をClaI及びSmaIで消化し、C-terminal HD-LR蛋白質を有するヒルトPDIの3'セグメントを含む、0.4kbのClaI-SmaIフラグメントをゲル精製した。KUG19をBamHI及びEcoRIで消化し、得られたベクターフラグメントと、0.7kbのBamHI-ClaIフラグメント及び0.4kbのClaI-SmaI

Pco*R*I フラグメントの両方と連合してプラスミド pU_{C-MP}を 1-H-PDI (HD-E-L) と呼ぶ。該プラスミドを S.mH で消化し、PDI 1 カセットを有する 1.7 kb の S.mH + pU_mP フラグメントをゲル電気泳動し、プラスミド pU_{C-MP} (第 6 項) の S.mH 部位に連合して、プラスミド pU_{C-MP} + 1-H-PDI (HD-E-L) を得た。次いで該プラスミドを酵母當 S.m + S.2 に及び P.yu 1 で活性化し、その無効化された、発現がカセットを有する 2.6 kb の S.m + S.2 フラグメントをゲル電気泳動し、平滑末端化した。pUC18-S-YG2 ベクターを S.m + S.2 で活性化し、又いで酵母の S.m + S.2 平滑末端化フラグメントに連結した。得られたプラスミド pLYS2-MP-G1-H-PDI (HD-E-L) を H.p 1 及び G.p 1 RV で消化し、次いで G.p 1 Y188 及び G.p 1 Y95 の酵母変異株を使用した。得られた各酵母株は (実験例 1 に記載のように) ゲノム DNA のケンタブロットで確認し、該菌の発現カセットが G.p 1 Y52 施に組み込まれていることを確認した。G.p 1 Y188 菌は最初は G.p 1 Y52 とならなかった。

LYS2菌の輸込み発現カセットから離脱PDIタンパク質を過剰発現する酵母菌の検定

完全酵母 PDI-1 遺伝子を有するプラヌリコ CT (両側列に記載) を EcoR V で消化し、酵母 PDI 製造菌中 (ORF) の C 端側部分 (アミノ酸 223 個から ORF の末端まで) と 3' ポリジクレオチドを含む 3' 3 kb の Eco RV-EcoRV フラグメントをゲル精製し、プラヌリコ PATA15S (Twigg, A. G. 及び Sherratt, I., D., 1989, Nature, 282, pp. 216-218) の Eco RV 位に導入して、pUK16S を得た。古いモザイク型 PDI-7 を DraI で Eco RV で消化し、酵母 PDI-1 ORF のアミノ酸 6~222 をコードする G, 6.7 kb の BamI-Eco RV フラグメントをゲル精製し、下記の条件でリゴマクレオチドアグリマーと連絡した：

5'-GACGCCAGAAGAAATGAACTTTCGTGCTG-3' (配对编号: 10)

2'-STATISTIGETSTACTGCAAGACGACCGA-5' (序列编号: 15)

既オリゴアクリオチドアグブターはそれぞれ Ban に及び Ban 付電離基を有し、前者 PDI-CRF のアミノ酸より S と I は強烈な親水性であり、非親水リーダー配列を有する。

13

特審平7-508881 (23)

マークする。(ATG開始コードは下線で示されている)。
添られたD, TとDの亜基酸H₂—SCORVアラゲメントをグルコシジ、或いで、アメCORVアラゲ亜基酸H₂で活性化していくATGまことにサブタローニングして、
アラゲンドリオキシル化する。

プラスミドを UKC169 を E.coli RV で消化し、それを漏出された。酵母 PDI「のホロC末端部分を有する」、3 kbp の E.coli RV - ホロ C 端 RV フラグメントをアルカリ性解離して、次いで UKC170 のホロ C 端 RV 部位に消化し、それによって得た数種の（完全性）酵母 PDI（YPD17）遺伝子を再構成した。このようにして得たプラスミドを UKC171 と命名した。

DUC K C 175 を Econ にて調査し、y やり ヒト 健康を有する異なれた 2、3 のプロテクメントを平滑化されし、アルゴリズムだ。DUC K 19 在 Econ 及び Sma にて調査し、早期事事化し、初期平滑化 Econ と y D にフライメントを連結した。追跡既往歴を用いて且、con con DH における影響を軽減し、再された影響評価が本ら、p C con モリキンカー内の B con H con 部が g con ローディング評価の g con 本筋に接觸して配置されるよう

に進歩的方向で α -PDI導入を実現するプラスミドを企むものについてスクリーニングした。E. coli「フラグメント上の α -PDI-ORFの5'末端はBam HI部位が既に存在していたため、脱酰基素(pUC19- α -PDIなど)はこの場所で、3'-Kb bpのBam HIフラグメント上には α -PDI-ORFを含む。pUC19- α -PDI(=Bam HI)で消化し、PDI遺伝子を有する1, 2, B-Sma HI-Kb bpフラグメントをゲル電気泳動、次いでペクター-pUC18-GAL100c(β)-ADH1: (ストック番号492)(第6図)のB-Sma HI部位にサブクローニングした。導入されたプラスミドpUC18-GAL1.0-PDI- α -PDI-ADH1: (第7図)はストック番号1015である。プラスミドpUC18-GAL100c- α -PDI-ADH1:はSma I, Sph I, Eco RI, Sac Iで消化し、端部カセットを有する2, 7Kb bpのSma I-エヌクレオフラグメントをゲル電気泳動、平滑面消化し、次いでOKUC171(pUKC171は、平滑Eco RI及びHind IIIで消化して得たpUC171にサブクローニングしたY1p6000(Barley esterase gene, 1986, 前出引文文献)の4, 5K Eco RI-

植物学 14

JRバス関東への組込み強度カセットから群馬アコトを導入
既存する競合様の構造

ブテヌミドリ U C - N o t - U R A S (基因群 8) を大
きな量及び H C G 1 で発現し (U R A 3 遺伝子を一部分を
欠失させるため) 、単倍体化した。ブテヌミドリ U C 1
H - G A L 1 L O n - v P D I - A D M 1 (ベクター B)

S₂を1次びS₂Hで染色し、GAL10-p_{DPI}-ADH1を飛騨カセットを有する2、3回目のS₂CRとS₂Hフラグメントをゲル電気泳動、半透膜法染色し、前記バクターフラグメントと連絡して、プラスと_{Dpn}I-N₁-GAL10-p_{DPI}-ADH1を導入した。N₁G1での消化により、_{Dpn}I-N₁-GAL10-p_{DPI}-ADH1からURA3-G-A₁と_{Dpn}I-p_{DPI}-ADH1-U_{RA3}組み合せカットを切り出した。得られた細胞フラグメントを用いて供試株KNY1076を同質交換した。5-フルゴローラボロト液含有固体培地上で (Beekes, 1984, Mol. Gen. Genet., 197, pp. 345)、ura^r形質転換体を選択した。導入されたura^r形質転換体に由来するゲノムDNAをE_{coli}で染色し、GAL10-p_{DPI}-ADH1を含むカセット由来の放射能標識したE_{coli}S₁-p_{Y_{U3}}フラグメントをプローブとして用いて、ラジオプローチにより選択した。所選のGAL10-p_{DPI}-ADH1を飛騨カセットを_{URA3}に組み合せた新規株が确定された。既報株K-1とは、URA3に組み込まれた複数のコピーを有していた (Kobayashi 1986)。新規株K-1とは、URA3に組み込まれたコピーを一つだけ

告していた(特2137)。

実験例 15

酵素活性測定のアドツタンパク質質の検索

酵母株を、 $3 \times YEPD$ 媒体培地で、 23°C で 24 時間増殖させた。24 時間が経過した後、各物質にガラクトースを最終濃度 4% まで加えた。次いで培養物を 23°C で新たに 24 時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を $3 \times YEPD$ で 30°C で 8 時間培養した。細胞を回収し、無菌冷水で洗浄し、重量の $3 \times YEPD + \text{ガラクトース}$ 培地に再懸滴させた。酵母株を更に 1~2.5 時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法 2 (下記) で抽出した。

タンパク質の抽出:

本實例に用いた方法は¹ Goto の方法 (¹⁹⁸⁸, Gene, 頁 1, p. 1~14) に依り、ガラクトース培地を用いて、酵母細胞抽出液は通常酵母からタンパク質を抽出した。

方法 1: 2% のトリリン酸鉄液を pH 7.0 の PMSF (0.5 mM) の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

行い、次いで酵母一細胞サイクルにおけるタンパク質を抽出し、 $10,000 \times g$ で 10 分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PMSF (固体)、酸性アンセニウム (0.8%) 又は硫酸銅 (濃度 < $100 \mu\text{M}$) での処理の効果は試験、酵母培養液に分離により最初に分離を評価した。タンパク質濃度は Bradford の方法 (¹⁹⁷⁶, Anal. Biochem., 72, p. 248~254) で測定した。

方法 2: 方法 1 によって、既に培養培地に NaOH 及びターミナルカルボキシテアールを (それぞれ最適濃度 0.2 M 及び 1%) 加え、水上に約 10 分間放置し、その後 23°C で最終濃度 8% で加えて、細胞内詰料を溶解した。水上で 30 分間振盪した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、ナセソントン洗浄し、SDS-PAGE ローディング後電気泳動装置を用いた。

SDS の全酵母性タンパク質を、本實例に Schulz らの方法 (¹⁹⁸⁷, Gene, 頁 1, p. 119~123) に従って、一次元 SDS-PAGE (1.2% ポリアクリルアミド) 及びターマーシーブルー染色で分析した。

次の条件で電気泳動を実施した。1.0% SDS-ポリア

クリルアミドゲル及びレーン当たり 1.0 μl のローディングされたタンパク質 (タンパク質抽出方法 1)。既てのゲル中で 1.5 mg/m² の銀染色分子量標準を使用した。ゲルは Bio-Rad mini-Protein II ゲルシステムで後処理した。タンパク質濃度を計算せずに、細胞外漏出物をレーン当たり 1.5~2.0 μl でローディングした。電気泳動の箇所、電圧は 20.0 ボルト以下に既終了した。

Bio-Rad Extra 耐塩性ウエスタンプロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースに転写しました。ニトロセルロース膜を 5% (w/v) の脱水硫酸鋼溶液で 1 時間ブロッキン後、洗浄し、1:500~1:1,750 の各抗体で 8 時間から一夜にわたり、ECL リバーカーネル液体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ活性を青ウサギ IgG を最終濃度 1:100 で用元、インキュベーションを 1 時間実行した。洗浄後、Anti-mouse ECL キットを酵母細胞の伝導液に作用して、プロットを洗浄した。

最初のアッセイでは、株 3072A が分離 Δ ド¹をウェスタンプロットで検出できるレベルで確認することが可能でした。使用した ECL プロトコルでは、検出レベルは、

0.5 μg の酵母ウエブリ¹ であった。この分離 Δ ド¹は、 300 kDa カットオフ濃度によって選択されたため、二重体であることが判明した。株 3072A と対照する HDEL 蛋白質 (¹⁹⁷⁹) を比較すると、ヒト PD¹ は四方から分離されていた。この実験では、酵母培養ノード条件を、増殖速度 (d) 及び諸多形態について最適化した。前回二つの株は、 23°C で培養し一夜で 8.0×10^6 CFU 8 時間培養するか、又は 30°C で 1.5 時間の内に洗浄するなど、より高い PD¹ 合成レベルを示した。

実験例 16

酵母内でアンチスクシンを表現させるためのベクターの開発

アンチスクシンは血凝固因子 X の機能性タンパク質粗抽出物である。アンチスクシン (ATS) は、ヌクシコヒルズ Elementaris の (Netherlands, 著, 1988, J. Biol. Chem. 263, p. 2002~2010)。その後、ATS をコードする cDNA が Hahn, F. C. 著, 1988 により単離され、構造が解明された (¹⁹⁸⁸,

Gene, 75, pp. 47-57)。ATTSは、組換え技術によって分離された真核タンパク質中の前立腺及び膀胱等のジスルフィド結合の水酸に対する高レベルのPDI活性の影響を評価する上で適切的なリポータータンパク質である。なぜならATTSは、タンパク質が生物学的活性を有するようにするために正確な対を形成しなければならない10個のジスルフィド結合を有するからである。

粗張ベクターpK4a-2 (Jacobson et al., J. A., 6, 1985; Gene, 86, pp. 511-516)を用いて、細胞内でのATTSを表現させた。粗張ベクターは、ガラクトース誘導子GAL4とプロモーターと、真核タンパク質の分離を制御するための酵母T4F42Dブレロ分離リーダー開削とを含む。ATTSをコードする部位は、クローンスC-4 (Horn, J. H. et al., 論文引用文献)に沿うるサブクローニングしたATTS cDNAを基質として表現し且つ下記のオリゴタケレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で合成した。
 1. 5'-ATATGGATCCCTGTCTTGGATAAAGAACAGGACCATTTGGGC
 CCGGGTG-3' (登録番号: 1-6)
 2. 5'-TATAGGATCCCTTAATGATTAACGCTTGGATTCCTT-3'

(比例番号: 1/9)

これらのプライマーは両方とも、P-GC座標のサブクローニングを容易にするためにBamHI部位を含む。第一のプライマーは、酵母KAN2とlacZのニンドプロテアセナセフタミド (LacZ-α-NBT-FDNB) 由来の、成熟ATTSの第一とノ脱羧基に挿入する (酵母KAN2のP末端プロテアセナセフタミドのC末端側で切断する)。PCR産物をBamHIで消化し、ゲル電気泳動して、pK4a-2/ATTS (K991) (第8回) を得た。次いでこの粗張ベクターを用いて、スフェロプラスチカ (Hinnonen, L. O. 1978, 細胞形態学) で、著しく示す細胞増殖能を測定した。

ロイシンを含まない合成培养液 (Schoeller, L. O. 1987; Gene, 87, pp. 123-133) 上で細胞増殖体を選択し、クローン單離体についてストライクし、これらの单離体を最終の分離で使用した。換は、1.7%グリセロール含青金剛樹脂中で-70°Cで貯蔵することにより保存した。

実験例 1-7

アンチスタンシンの活性に関する検討及びPDI活性発現の抑制及び誘導

K991細胞培養液 (K991-8株)、豚臍もしくはヒトPDIを過剰発現する細胞の形質転換細胞とを、下記の方法でアンチスタンシンの分離に関して評価した。培養された胚子を-70°C冷凍タッセルストックからロレン金合育成液天平プレート上にストライクし、30°Cで2日間培養をせた。5mlの3XYEHD (60g Difco) 豚臍抽出物、30g ハツリバヅン、4.8gグルコース/1L) 培地を入れた培養瓶 (18×150mm) に小ループー杯の細胞を播種し、定期的にテラリウム上で23°Cで約18時間インキュベートした。この後まで、ガラクトースを濃度濃度4、8K (w/v) で加えて細胞を培養し、培養瓶を23°Cで更に3日間インキュベートした。次いで、遠心分離で細胞を回収し、所蔵培養液上清をアンチスタンシン活性のアッセイのために採取し、活性を酵母KAN2の尿素によって測定した【カリコ, L. O., 1988, 細胞形態学】。新規紳は三つ組みで実施した。結果を要約して表2に示す。

細胞株名	可変株	元の細	PDI ^a 活性 ^b
950	239	JRY166	なし
1105	2072A	JRT159	アルファ-hPDI
1176	1157	JRT169	yPDI-hPDI
1175	1166	JRT160	hPDI-hPDI
1292	1279	JRT188	alpha-hPDI (HDEL)
1294	1267	JRT188	hPDI-hPDI (HDEL)
1295	1266	JRT188	yPDI-hPDI (HDEL)
1177	1152	JRT168	yPDI
1156	546	JRT107	なし
1154	1136	JRT107	yPDI-A1
1155	1137	JRT107	yPDI-A2

+ PDIカセット及び神経は次のように実験内に記述されている: アルファ-hPDI、実験例9: yPDI-hPDI (yPDI-hPDI)、実験例10: hPDI-hPDI (HDEL)、実験例11: alpha-hPDI (HDEL)、実験例12: yPDI-hPDI (HDEL)、実験例13: yPDI-A1及びyPDI-A2、実験例14。

* 神經粗抽出はK991アンチスタンシン系細胞を含む。

図2

表

	ATS/L.D.O.D.	相対レベル
JXT100	13.6	1.0
JXT100/hPD-hPD1	24.4	0.95
JXT100/yPD-hPD1	28.4	1.11
JXT100/alpha-hPD1	17.2	0.9
JXT100/yPD2	65.1	2.54

基準値 1.0

JRY1888がHDBL活性化程度ヒトPDIを過剰発現する濃度比によるアンチスクラン分率の評価

K391形實験株JRY1888と、三つの異なる分離リードーを有するHDBL活性化異体形ヒトPDIを過剰発現する原核細胞株とを実験例17に記載のように培養し、増殖培地培養液を、実験例17に記載のように因子Xと抗原アッセイで分離ATスレベルについて評価した。結果は表3に示す。

図3

表

	ATS/L.D.O.D.	相対レベル
JXT100	10.0	1.0
JXT100/hPD-hPD1(MEL)	27.5	1.55
JXT100/yPD-hPD1(MEL)	29.0	1.63
JXT100/alpha-hPD1(MEL)	31.3	1.74

基準値 1.0

過剰発現株JRY1077が過剰PDIを過剰発現する濃度比によるアンチスクランの分率

K991形實験株KHY1077と、背景PDIを過剰発現する既存の形質転換株とを増殖し、増殖培地培養液を、実験例17に記載のように因子Xと抗原アッセイで分離ATスレベルについて評価した。結果は表4に示す。

図4

表

	ATS(L.D.O.D.)	ADOD	ATS/ADOD
KHY107 A1	0.314	23.9	0.013
KHY107 A2	0.286	24.5	0.010
KHY107 A3	0.334	25.5	0.013
K-Y1 A1	1.166	24.0	0.047
K-Y1 A2	1.169	21.0	0.043
K-Y1 A3	1.143	25.3	0.045
K-Y3 A1	3.656	29.0	0.099
K-Y3 A2	3.144	31.2	0.042
K-Y3 A3	1.920	48.0	0.039

K-Y1は、URA3に多量コピーギAL-γPDIを有するKHY1077である。

K-Y3は、URA3に低コピーギAL-γPDIを有するKHY1077である。

A1、A2及びA3は、平行して評価した背景された株のクローニング細胞を示す。

過剰PDIの過剰発現の結果、増殖培地Y3-A1の場合は、ATS活性の分率が過剰当たりベースで2倍に増加し、直接ベースでのり他の分率が相殺される。

基準値 2.0

多量コピープラスミドから無性PDI】又はヒトPDI「生産能効率化する酵母宿主の選定

多量コピー導入シャトルベクターYRp24 (Saito et al., D. G., 1979, Gene, 8, p. 17-24)は、酵母2LクロロンDNA複合遺伝子、ウツシル制御有効長さ場所を過剰するための酵母URA3選択子を含む。YRp24をBamHIで消化し、得られた7.8 kbpのBamHIベクター-フランメントをセル培養した(フランメントa)。プラスミドUC18-GAL10-p-γPDI-ADH1 (<#1015>)をEcoRI、SphI及びSalIで消化した。その結果得られた、#15.1 kbpのEcoRI-SphIフラグメントを有する2.8 kbpのEcoRI-SphIフラグメントをゲル精製した(フラグメントb)。プラスミドpUKC16.1

を E. coli 及び HindIII で消化し、GAL1p-MFα1 プロモーターと PDI 活性カセットを有する 2.8 kbp の EcoRI-HindIII フラグメントをゲル精製した（フラグメント c）。前記三つのフラグメントを平滑末端化し、次いで平滑の核酸で互いに連結した。（1）ベクターフラグメント及びフラグメント b を互いに連結してプラスミド YRp24-GAL10p-PDI（第 1 図）を得る；（2）ベクターフラグメント及びフラグメント a を互に連結してプラスミド YRp24-GAL1p-MFα1-PDI（第 1 図）を得る。得られた前記二つのプラスミド DNA の水銀試 CcC1 試験を行った。二つの供試の活性質検査結果で、酵母株 YR188 を用いて同定ベクター K-18（実験例 1）及び YRp24-GAL10p-PDI は YRp24-GAL1p-MFα1-PDI で陽性結果を示した。両方のプラスミドを含む形質転換体、ロイシン及びウラシル耐性を失した台形培地で測定し、承継した酵母株（Single colony）を同一培地上で再びトリマーとしてクローリング操作を施した。二つの元の同時形質転換の各々についてその他の承継クローリング操作名、培養管内の

5 ml の 3XYE 培地に接種し、適温培養ロードラムで 2.3 ℃ で 24 時間インキュベートした。24 時間が経過した後、ガラクトースを添加濃度 4.8% を加え、培養液を 2.3 ℓ で更に 5 日間インキュベートした。遂に分離によって細胞を回収し、活性化所見上譜を図 2 と從者アッセイで ATS 活性レベルについてアッセイした。YRp24-GAL10p-PDI プラスミド及び ATS 活性ベクターを含む形質転換体は、ATS 活性ベクターのみを含む標準 YRp248 株と比べると、単菌体において 3~20 倍の分離 ATS 活性レベルを示した。YRp24-GAL1p-MFα1-PDI は PDI プラスミドと ATS 活性ベクターを含む形質転換体は、ATS 活性ベクターのみを含む標準 YRp248 株と比べて、2~3 倍の分離 ATS 活性レベルを示した。

実施例 2 類

前記の複数タンパク質の活性を用いた同一酵母ベクターから異型又はヒストロ PDI を過剰発現する酵母宿主の構造及び製法

2. Substrates of the GAL1p and GAL10p

既子を、分株型（divergent）GAL1p 和 GAL10p 上 1.0 プロモーターと共にこれら二つのプロモーターの TATA ハボックスの間に位置する共通 AAT 4 組合ドメインとそれを二つの構造遺伝子の間の領域から分離的に（divergently）配列したプラスミド pUCB272 (Johansen, M., and Davis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440) は、この分株型原生 GAL1-GAL10 プロモーターを G. 85 kbp の EcoRI-HindIII フラグメント上に含む（HindIII 領域には導入した内部 SalI 領域も有する）。このプロモーター-フラグメントを使用して、分株型プロモーターカセットベクター pUC-GAL1/10 を構成した。該ベクターは次の性状を有する。前記原生 GAL1 及び GAL10 領域により、この順序で、酵母並用 HindIII 終端ターミネーター（0.35 kbp HindIII-HindIII フラグメント）から分離した酵母並用 2.0 プロモーター。并用 HindIII 及び HindIII 領域により AADH1 が各ターミネーターの第二のコピーから分離した酵母 GAL1 プロモーター。二つの AADH1 ターミネーター-ユレメントの 3' 末端は、分株型プロモーター

活性化カセット全体を BspHI フラグメントとして連結できるよう、BspHI 領域によってアランクシングされている。このプラスミド内のベクター区域は、ボリリガーナの代わりに前記活性カセットを有する pUC118 である。

プラスミド pUC-GAL1/10 は EcoRI で消化し、ゲル精製してフラグメント「a」を形成した。プラスミド pUC118 を BspHI で消化し、滅活ヒストロ PDI コーディング配列にインサートム配位としたアルファ因子プロモーターを有する 1.9 kbp の BspHI フラグメントをゲル精製し、ベクター-フラグメントに連結して、プラスミド pUC-GAL1/10-H-PDI を得た。該プラスミドでは、アルファ因子プロモーターと PDI 配位が GAL1 プロモーターの始頭下にある。プラスミド pUC-GAL10p-PDI-ADH1 (実験例 1-3) を EcoRI で消化し、その結果得られた、酵母 ADH1 コーディング配列を有する 1.7 kbp の BspHI フラグメントをゲル精製し、次いでベクター-フラグメントを連結して、プラスミド pUC-GAL10p-PDI を得た。該プラスミドでは、GAL1 プロモーターが酵母 PDI の発現を制御する。このようにして得た二つのブ

ラスミドを三重化し、平滑素変化し、それ故に hPD1 及び pPD1 カセットを有するベクターカラメントドを製造した。

ATS 発現ベクター (K991) を Sph I 及び Eco RI で消化し、收获 ATS のコーディング配列にインフレーム適合したアルファ因子プロモーターを有する Sph I - Eco RI フラグメントをゲル電気泳動し、平滑素変化し、切削の反応で二つの平滑素変換ベクターフラグメントを及びて得られた。制限酵素で調べて正確な構造を有する得られたプラスミドを、それぞれ pUC-GAL1 と p-PD1/ATS (図 1 図) 及び pUC-GAL1 と p-PD1/AT5 (図 2 図) で構成した。これら二つのプラスミドを Sph I で消化して発現カセットを遊離させ、p-PD1 開放区は p-PD1 開放変換カセットを有するフラグメントを、すなわち Sph I で消化した開放シトルベクター pG1/1 (Rosserberg, G. S., 1984, Nature, 312, p. 77-80) と連接した。その後、ニコラのプラスミド、pG1/1-GAL1/10-pPD1/ATS が得られた。これらのプラス

ミドでは、ATS 及び PD1 開放変換カセットが、それぞれ Sph I と Eco RI によるカット位点の制限下で同一の断片がベクター上に存在していた。

次いでこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母作 ERY188、BJM1995 及び他の適当な酵母宿主を感染させた。感染性試験用ロイシン感受性培地上で増殖し、得られた酵母細胞を、上述実験例に記載のように、ATS 及び PD1 の発現 / 分泌について評価した。

表 5 (下記) に示す結果から明らかのように、p-PD1 を過剰発生する酵母株は、pK442-2/ATSのみを含む对照株と比べて最高高いレベルのアンチスクレン分認する。また、酵母 pPD1 を過剰発生する酵母株は、対照株と比べて 3~17 倍高いレベルのアンチスクレン分認した。

実験結果 2

pK442-2/ATS 過剰発生酵母株によるアンチスクレン分認の発現に対する影響

アンチスクレン異種ベクター pK442-2/ATS 及び pK442-2-GAL1-p-MP4-p-PD1 で用いた質粒をした株 (JM109-E. coli) の過剰した開放区を、23°C 又は 30°C の条件下で増殖後アンチスクレン分認について評価した。アンチスクレン異種ベクターのみで開放変換した株 (JM109) を平行して増殖した。23°C 又は 30°C 又は 30°C で一晩増殖した後、ガラクトースを最終濃度 4~8% で加えて酵母培養物を培養し、23°C 又は 30°C の適当な温度で更に 5 日間増殖した。培養液 3~5 日で採取した培養液を、四子又は五倍量アセトニトールに於けるアンチスクレン活性は、PD1 を過剰発生する株での単純化について、酵母 3 日目及び 5 日目の両方で、温度を 30°C にした株よりは 23°C にした株の方が確かに大きかった。

菌株	アンチスクレン (ng/L)*
pK442-2/ATS	
開放区 1	4.2
開放区 2	5.5
開放区 3	3.9
開放区 4	4.6
開放区 5	5.1
 pK442-2-GAL1-p-MP4-p-PD1	
開放区 1	3.9
開放区 2	11.7
開放区 3	5.6
 JM109 大腸	
開放区 4	26.0
開放区 5	8.1
JM109	1.5

* 23°C で培养後 5 日目の収量。

試験番号	温度 (°C)	アンチスクランジング率(%)	
		30	35
YPD1-1	30	0.62	2.12
YPD1-2	30	1.34	2.68
YPD1-3	30	5.45	19.25
YPD1-4	30	7.00	15.92
JRN159 同様	30	0.38	0.65
ABD1-1	30	0.49	0.47
ABD1-2	30	0.42	0.47
YPD1-1	30	2.29	4.45
YPD1-3	30	2.71	2.56
JRN159 同様	30	0.34	0.30

* 以上のYPD1菌株は、アンチスクランジング率ベクターYEP293I及びYEP24-GAL1Op-MF6- α -T PDIの両方を含んでいた。YPD1菌株は、ベクターYEP293I及びYEP24-GAL1Op- α -T PDIの両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム組みした真正(Caenorhabditis) ME-1(プレプロリード配列を含む組成のTAP表現ベクターpKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP(Neep et al., 1990, 種苗開拓文庫)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改変するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACGCCCGTC TGTGCTTA-3' (配列番号: 20) 及び
5'-ACTGGATCCGAACTGAGCT TAGTGCGAAG CCT-3' (配列番号: 21)

を用いるボリノターゼ連鎖反応(PCR)で、DNA新規として使用した。

該PCR反応は、当筆者に良く知られている方法(Johnson, M. A. 編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA)で実施した。得られたPCR産物をダイアリタケレードターザゲーテン酸化し、BamH Iで消化し、次いでゲル懸濁して、T

PDIを活性化する組成元素組成によるマダニ抗原ペプチド(TAP)の分離

マダニ抗原ペプチド(TAP)は、虫草菌属菌子Xと強力な高選択性阻害剤である(Waxman, L. G., 1990, Science, 248, pp. 503-509)。TAPはマダニ α -コントローラー活性由来するからである(Waxman et al., 1990, 種苗開拓文獻)。TAPは、ガラクトース耐性酵素Gal1-10プロモーターと、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム組み込んだ構成ME-1プレプロリード配列と共に同一表現ベクターpKH4-TAPを用いて、無菌内で表現された(Neep et al., 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリードのアミノ酸79の位置に配列されたBamH Iクリーニング部位の存在を確認して、少し改変されたME-1プレプロリード配列を含む(Neep et al., 1990, 種苗開拓文獻)。

A Pコードイング配列の正確な3'末端に苯環水素を有し且つ既報技術コンドンの3'側に付着するBamH I末端を有する、0.1-2kbのプラントBamH Iラグメントを得た。

ベクターpKH4-3B(Hofstein, K. 及び Johnson, L. D., 1991, Gene, 101, p. 105-111)は、ME-1プレプロリード-エディティング配列の3'末端に苯環水素BamH I部位を含む。pKH4-3BはBamH Iで消化し、T4-DNAポリメラーゼで複数して苯環水素化し、BamH Iで消化した。得られたプラントBamH Iベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.1-2kbのプラントBamH I-TAPフラグメントに連結して、ベクターpKH4-3B/TAPを得た。

別途の酵素起始反応で、酵母起始J1995、JRY18及びU90を、ベクターYEP24-GAL1Op- α -T PDI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-3B/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む同時に質転換体を、ヨウシン及びサシルの両方を失失した合成功能上で選択し、選択した單離系を同一培地上で対ストリ

ケして、クローン細胞体を運びした。図4のベクター／
質粒同時形質転換の名義について三つの前記クローン細胞
体を、培養液内の5mMの4-N-ダルゴース含有カラム外
界液質のx-leu・導出(x-leu-Ura+)に接種し
た。培養液を培養培養ローラードラム内で30℃で24
時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を
遠心分離によって回収し、4-N-ダルゴースを含むもの
の5×シリカリットルあたり濃度をさせた。得られた培養
物を30℃で風に48時間インキュベートした。次いで細
胞を遠心分離によって回収し、増強化培地試料をSCE-X-
HPLC又は固子X-5柱をアッセイにより分離TAAアレペ
ルについて評価した(Wellmann et al., 1980)。前記引
用文献)。別の方針として、培養支錐母液を23℃で2
時間培養後、グラクトースを始め濃度まで加えること
により評価し、次いで23℃で更に5時間インキュベート
した。次いで、増強化培地試料を前述のように分離TAA
レベルについて評価した。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6アミノ酸

配列の型：アミノ酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列
Trp Cys Gly Val Cys Lys
1 2 3 4 5

配列番号：2

配列の長さ：4アミノ酸

配列の型：アミノ酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列
His Asp Glu Lys
1 2 3

配列番号：3

配列の長さ：6アミノ酸

配列の型：アミノ酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Tyr Cys Gly Pro Cys Lys
1 2 3 4 5

配列番号：4

配列の長さ：10アミノ酸

配列の型：アミノ酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Phe Tyr Asn Pro Trp Cys Gly His Cys Lys
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

配列番号：5

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CTTACGCTGT CCACACCATC TGGCGCTCAA

39

配列番号：6

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

側の鎖：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATTTGGCGGC GCAAGCTTC CGCCGC

29

配列番号：7

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

配列の性質：一本鎖	配列の種類：c DNA	
トポロジー：直鎖状	配列	
配列の種類：c DNA	TCCGGCGCTT CAAAG	
配列	16	
AGCTTCCCCC CGGAGCTTGC CGCGCG	24	配列番号：1.0
配列番号：3		配列の長さ：7.3 基塩基対
配列の長さ：1.5 基塩基対		配列の型：核酸
配列の型：核酸		鎖の数：一本鎖
鎖の性：一本鎖		トポロジー：直鎖状
トポロジー：直鎖状		配列の種類：c DNA
配列の種類：c DNA		配列
配列		TCACGCGA AGAACAGGTT GCGCGCGG CTGTGTTTG TGGCTGTCG CTCGGCGG 40 CGCGCGCGCG CGCG 43
ATTTGATTGA CGCGCG	43	
配列番号：9		配列番号：1.1
配列の長さ：1.5 基塩基対		配列の長さ：7.3 基塩基対
配列の型：核酸		配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖		鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状		トポロジー：直鎖状
配列の性質：c DNA		
配列		
ATTTGATTGA CGCGCG	43	
配列番号：1.1		
配列の長さ：7.3 基塩基対		
配列の型：核酸		
鎖の数：一本鎖		
トポロジー：直鎖状		
配列の性質：c DNA		
配列		
配列番号：1.2		
配列の長さ：8.8 基塩基対		
配列の型：核酸		
鎖の数：一本鎖		
トポロジー：直鎖状		
配列の種類：c DNA		
配列		
ATTTGATTGA CGCGCG	43	TCGGCGCG CGCGAGGTT AGAGGAGGCG CGCGCGCG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG 40 CGCGCGCGCG CGCG 43
配列番号：1.2		
配列の長さ：8.8 基塩基対		
配列の型：核酸		
鎖の数：一本鎖		
トポロジー：直鎖状		
配列の種類：c DNA		
配列		
ATTTGATTGA CGCGCG	43	
配列番号：1.4		
配列の長さ：9.1 基塩基対		
配列の型：核酸		
鎖の数：一本鎖		
トポロジー：直鎖状		
配列の種類：c DNA		
配列		
ATTTGATTGA CGCGCG	43	CGCGCGCG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG 40 AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG AGAGGAGGAGG 43
配列番号：1.5		
配列の長さ：8.8 基塩基対		
配列の型：核酸		
鎖の数：一本鎖		
トポロジー：直鎖状		
配列の種類：c DNA		
配列		
ATTTGATTGA CGCGCG	43	

配列の長さ： 25 基塩基	配列の長さ： 23 基塩基
配列の型： 横線	配列の型： 横線
塩の数： 一本鎖	塩の数： 一本鎖
トポロジー： 直鎖状	トポロジー： 直鎖状
配列の種類： c DNA	配列の種類： c DNA
配列	配列
ATTCGAGC CTGAGGTC ATGGGGCGA GCTTGTGTT GATGCGCT CTGCGTGCT GCGCGCGT GCTTGGCGG GCGGCGCG CGCGCGCG	GCACCAAGAG AGATCTTGAT TTTTGTGT G
配列番号： 50	配列番号： 51
配列番号： 51	配列番号： 18
配列の長さ： 81 基塩基	配列の長さ： 51 基塩基
配列の型： 横線	配列の型： 横線
塩の数： 一本鎖	塩の数： 一本鎖
トポロジー： 直鎖状	トポロジー： 直鎖状
配列の種類： c DNA	配列の種類： c DNA
配列	配列
GATCCACAA ACCAATGTC GTTTCVGGT G	ATAGATGATG TGTCTTGTAA TAAAGAGCA GCGGATTT GCGCGCGCG
配列番号： 52	配列番号： 53
配列番号： 17	配列番号： 19
配列の長さ： 34 基塩基	配列の長さ： 34 基塩基
配列の型： 横線	配列の型： 横線
塩の数： 一本鎖	塩の数： 一本鎖
トポロジー： 直鎖状	トポロジー： 直鎖状
配列の種類： c DNA	配列の種類： c DNA
配列	配列
TATAGGATCC TTATGATAAG CTTGGGATAA GCCT	CTGGAATCCG ATTCAAGCT TAGATGAG GCG
配列番号： 54	配列番号： 55
配列番号： 20	配列番号： 20
配列の長さ： 20 基塩基	配列の長さ： 20 基塩基
配列の型： 横線	配列の型： 横線
塩の数： 一本鎖	塩の数： 一本鎖
トポロジー： 直鎖状	トポロジー： 直鎖状
配列の種類： c DNA	配列の種類： c DNA
配列	配列
TICAACGGTC TCTGCTCA	TCTGCTCA
配列番号： 56	配列番号： 57
配列番号： 21	配列番号： 21
配列の長さ： 35 基塩基	配列の長さ： 35 基塩基
配列の型： 横線	配列の型： 横線
塩の数： 一本鎖	塩の数： 一本鎖

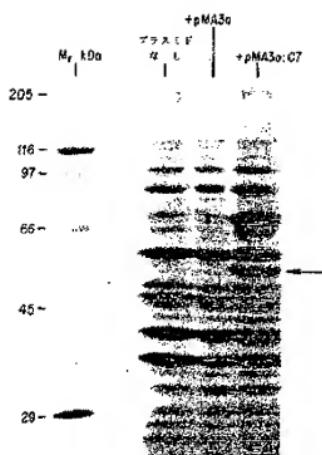


FIG. 1

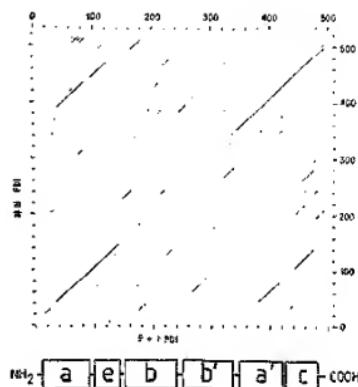


FIG. 2

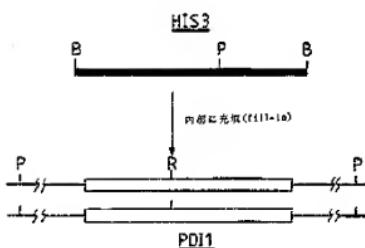


FIG. 3a



FIG. 3b

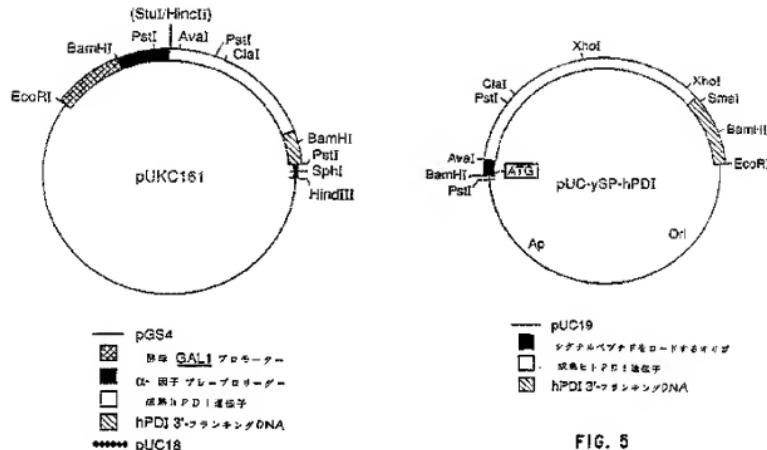


FIG. 4

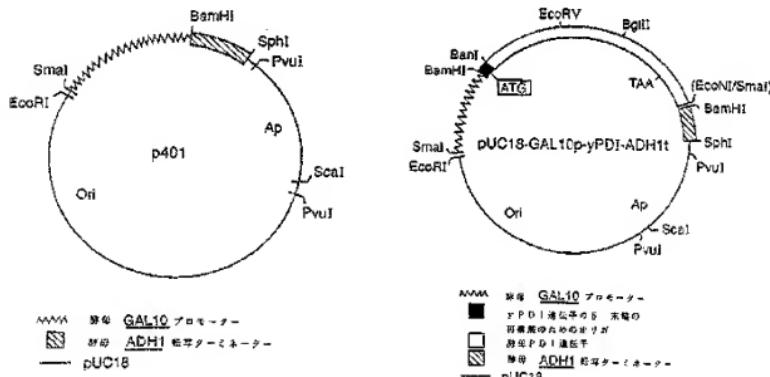


FIG. 6

FIG. 7

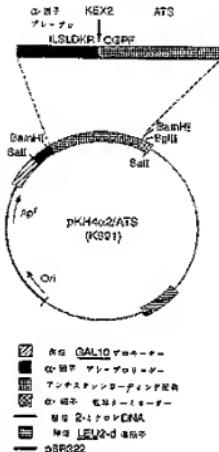


FIG. 8

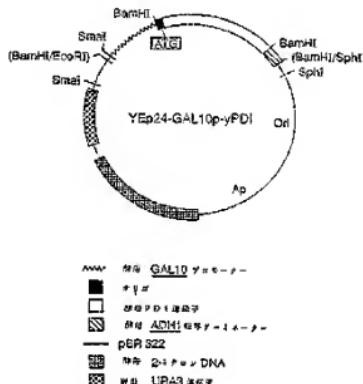


FIG. 9

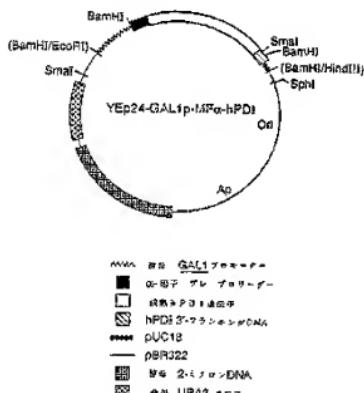


FIG. 10

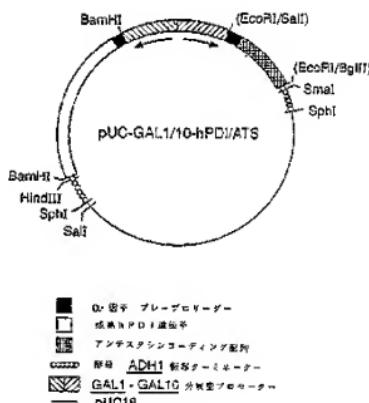


FIG. 11

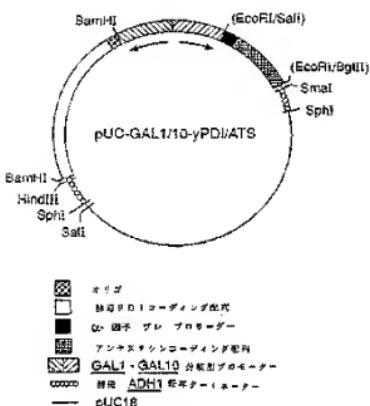


FIG. 12

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 認別記号 執内整理番号 F 1
 // (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:865)
 (C 12 N 1/19
 C 12 R 1:865)
 (C 12 N 9/90
 C 12 R 1:865)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
 TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CZ,
 FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, M
 W, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA
 , US

(72) 発明者 トウイート, マイケル・エフ
 イギリス國, ケント・シー・ティー・4.
 7・エヌ・ビー、チャータム・ハツチ、ナ
 イティンギル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン, ロバート・ビー
 イギリス國, ケント・シー・ティー・1.
 1・エクス・アール, カンタベリー、セ
 ント・オーガスティンス・ロード・43

(72) 発明者 シュルツ, ローレン・ディー
 アメリカ合衆國, ベンシルバニア・19438,
 ハーリーズビル, オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス, ロナルド・ダブリュ
 アメリカ合衆國, ベンシルバニア・19066,
 メリオン, シカモア・アベニュー・200

(72) 発明者 マーカス, ヘンリー・ゼット
 アメリカ合衆國, ベンシルバニア・19095,
 ウィンコート, ゾーンベリー・ロード.
 1517

(72) 発明者 モンゴメリー, ドナ・エル
 アメリカ合衆國, ベンシルバニア・18914,
 チャルフォント, ヒツコリー・レーン・9